



Departamento de Química Orgánica
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS AMINOGLICÓSIDOS

MEMORIA

que para optar al grado de Doctor
presenta

Sandra Giovana Zárate Villarroel

Madrid, 2013

Directoras: Dra. Ágatha Bastida Codina y Dra. Julia Revuelta Crespo

Tutora: Salomé Rodríguez Morgade

Departamento de Química Bio-orgánica
Instituto de Química Orgánica General
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



*Valora a quien te hace vivir,
quiere a quien te hace reír y
ama a quién te hace feliz.*

*A mi hija
con mucho amor y cariño
le dedico todo mi esfuerzo
y trabajo puesto para
la realización de esta tesis.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a aquel que me ha guiado por el camino de la felicidad hasta ahora y que solo él sabe quién es; en segundo lugar a cada uno de los que son parte de mi familia a mi PADRE que siempre me guía, mi MADRE por haberme dado su fuerza y apoyo incondicional, MI HERMANO mi segundo padre por todo su cariño y a mis HERMANAS por todo su apoyo que me ha llevado hasta donde estoy ahora.

Debo agradecer de manera especial y sincera a mis DIRECTORAS Dra. Agatha Bastida y Dra. Julia Revuelta por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por su apoyo, confianza en mi trabajo y su capacidad para guiarme, no solo en el desarrollo de esta tesis y en mi formación, sino también por toda su amistad a lo largo de este tiempo, siendo para mí como parte de mi familia. Muchas gracias y espero verles pronto.

Un agradecimiento a mi TUTORA la Dra. Salomé Rodríguez Morgade, profesora de la Universidad Autónoma de Madrid por haber aceptado ser la tutora de esta Tesis.

Al Dr. Andrés González por tu paciencia, motivación y tu amistad. Tanto esta tesis como yo tenemos mucho que agradecerte.

Agradezco también a todos mis compañeros de laboratorio y a las personas que he conocido fuera del ámbito académico que han enriquecido este trabajo con su participación y que con los años se han convertido en mis amigos.: Paulita y Dieguito con quienes sin duda he compartido más cosas a lo largo de este tiempo. Muchas gracias por todo vuestro apoyo y cariño que, me han hecho sentirme como parte de vuestra familia. Siempre estarán presentes en mi vida. A Mayca y a Hanna por todo su cariño y los buenos momentos que pasamos juntas. A Carlitos, por su simpatía y pintorescos episodios. A Seo-Ra mi compañera del laboratorio. No voy a olvidar todos los momentos que pasamos juntas fuera y dentro del mismo. A Mari, Delfi, Adeline y Bérénice gracias por vuestra compañía y vuestra amistad.

A Guillermo Corrales por su simpatía, su comprensión y su inestimable ayuda para hacer cualquier cosa cuando lo he necesitado.

Mis sinceros agradecimientos a todas las personas que pasaron por el laboratorio y que han aportado algo en la realización de esta tesis.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y personal durante este tiempo en España a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles. Algunas están aquí conmigo y otras en mi recuerdo y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todo lo que me han brindado.

Pero si hay alguien especial a la que quiero agradecer y dedicar todo mi trabajo es a esa persona por la que daría todo, que siempre está y estará en mi corazón. A mi hija Nicol, con todo mi amor.

En mi corazón habita un milagro llamado amistad. Gracias a todos.

LISTA DE ABREVIATURAS y ACRONIMOS

Å	Amstrong
A	Adenina
Ac	Acetil
AGL	Algoritmos Genéticos Lamarkianos
AACs	enzimas <i>N</i> -acetiltransferasas
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
ADT	Programa de docking Auto-Dock
AHB	4-amino-2-hidroxibutiril
AMP	Adenosín monofosfato
ANTs	enzimas <i>O</i> -adenil transferasas
APHs	enzimas <i>O</i> -fosfottransferasas
ARN	ácido ribonucleico
ARN_m	ácido ribonucleico mensajero
ARN_r	ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal
ARN_t	ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosin trifosfato
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOH	Acido acético
AcCoA	Acetil-coenzima A
ac.	Disolución acuosa
Ar.	Argón
API	Ionización a presión atmosférica
ATCC	Colección alemana de cultivos tipo.
Bn	Bencilo
^tBu	<i>terc</i> -butilo
Boc	<i>terc</i> -butiloxicarbonil
Bz	Benzoilo
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
C	Citosina
CI₅₀	Concentración inhibitoria que reduce al 50% la actividad enzimática.

<i>Cbe</i>	Etiloxycarbonil
<i>Cbz</i>	Benciloxycarbonil
<i>CECT</i>	Colección española de cultivos tipo
<i>DCC</i>	N-N'-Diciclohexilcarbodiimida
<i>DMF</i>	Dimetilformamida
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>DIAD</i>	Diisopropil-azodicarboxilato
<i>DIPEA</i>	N,N-Diisopropil-etil-amina
<i>DMAP</i>	4-(Dimetil-amino) piridina
<i>2-DOS</i>	2-desoxi-estreptamina
<i>eq</i>	equivalentes
<i>ET</i>	Etilo
<i>ES</i>	Electrospray
<i>FDA</i>	Agencia de Alimentos y Medicamentos Americana.
<i>FDE</i>	Fase Dependiente de Energía
<i>FDE-I</i>	Fase Dependiente de Energía I.
<i>FDE-II</i>	Fase Dependiente de Energía II.
<i>G</i>	Guanina
<i>GN-Pir</i>	N-N'-(Boc) ₂ -1H-pirazol-1-carboxamidina
<i>GN-Tf</i>	N,N'-(Boc) ₂ -N"-trifilguanidinio
<i>HPLC</i>	Cromatografía de líquidos de alta presión
<i>HNOB</i>	5-norborneno-endo-2,3-dicarboximida
<i>IDSA</i>	Sociedad de Enfermedades Infecciosas Americana.
<i>IE</i>	Impacto electrónico
<i>IES</i>	Ionización por electrospray
<i>IPTG</i>	Isopropil-tiogalactosido
<i>ⁱPr</i>	isopropilo
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Menten
<i>LB</i>	Medio de cultivo Luria Bertani
<i>MM2</i>	Método de cálculo de mecánica molecular
<i>MH</i>	Medio de cultivo Mueller-Hinton
<i>Me</i>	Metilo
<i>MS</i>	espectrometría de masas
<i>MHz</i>	megahertzios

<i>NADH</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<i>PCR-TR</i>	PCR a tiempo real real
<i>pdb</i>	Base de datos de proteínas
<i>Ph</i>	Fenilo
<i>PNA</i>	Acido Nucleico Peptídico
<i>ppm</i>	Partes por millón
<i>Py</i>	Piridina
<i>Rf</i>	Factor de retención
<i>RMDS</i>	Desviación cuadrática media
<i>RMN</i>	Resonancia Magnética Nuclear
<i>Rdto</i>	Rendimineto
<i>Sitio A</i>	Sitio de unión aminoacil-ARNt
<i>Sitio P</i>	Sitio de unión ptiptidil-ARNt
<i>SYPRO</i>	Colorante ORANGE empleado en la PCR-TR
<i>sat.</i>	Saturado.
<i>SPS</i>	Sistema de purificación de disolventes
<i>TEA</i>	Trietilamina
<i>Tf</i>	Trifluorometil-sulfonil (triflil)
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético
<i>t.a.</i>	temperatura ambiente
<i>TfN₃</i>	Trifluorometan-sulfonil azida o triflil azida
<i>THF</i>	Tetrahidrofurano
<i>TPSCI</i>	Triisopropilsulfonil cloruro
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>VIH</i>	Virus de inmunodeficiencia humana
δ	desplazamiento
$\\$	Dólar

INDICE

1. Capítulo 1. Introducción general	1
1.1.- Antibióticos	3
<i>1.1.1. Introducción a la problemática actual</i>	3
<i>1.1.2. Aspectos generales y clasificación de los antibióticos</i>	7
1.1.2.1. Antibióticos que interfieren en la permeabilidad y biosíntesis de la pared celular	9
1.1.2.2. Antibióticos que alteran la síntesis proteica	11
1.1.2.3. Antibióticos que afectan al metabolismo de los ácidos nucleicos	13
<i>1.1.3. Mecanismos de resistencia en antibióticos</i>	14
1.1.3.1. Modificación enzimática del antibiótico	15
1.1.3.2. Bombas de salida	15
1.1.3.3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa	15
1.1.3.4. Alteraciones del sitio de acción	15
1.2.- Antibióticos aminoglicósidos	16
<i>1.2.1. Introducción y evolución histórica</i>	16
<i>1.2.2. Características estructurales de los aminoglicósidos</i>	20
<i>1.2.3. Mecanismo de acción</i>	22
1.2.3.1. Interacción de los antibióticos con el ribosoma bacteriano	24
<i>1.2.4.- Mecanismos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos</i>	32
1.2.4.1. Disminución de la concentración intracelular de aminoglicósido	32
1.2.4.1.1. Reducción del paso de compuesto al interior	32
1.2.4.1.2. Activación de un transportador	32
1.2.4.2. Modificación de la diana ribosomal	33

1.2.4.2.1. Metilación del ARNr	33
1.2.4.2.2. Mutaciones en el ribosoma	34
1.2.4.3. Modificación enzimática del aminoglicósido	34
1.2.4.3.1. Aminoglicósido N-acetiltransferasas (AACs)	35
1.2.4.3.2. Aminoglicósido O-fosfotransferasas (APHs)	35
1.2.4.3.3. Aminoglicósido O-adeniltransferasas (ANTs)	35
1.2.5. Reacciones adversas: Toxicidad	38
1.2.5.1 Toxicidad acústica (otoxicidad)	39
1.2.5.2. Efectos neurotóxicos (nefrotoxicidad)	40
1.2.5.3. Bloqueo neuromuscular	40
1.2.6.-Estrategias para recuperar el uso de los aminoglicósidos:	
modificaciones sintéticas para la obtención de nuevos antibióticos	41
1.2.6.1. Metodologías generales para la preparación de nuevos Antibióticos	42
1.2.6.1.1. Modificación puntual de antibióticos aminoglicósidos naturales	43
1.2.6.1.2. Obtención de aminoglicósidos mediante glicodiversificación	46
1.2.6.2. Antibióticos aminoglicósidos sintéticos	48
1.2.6.2.1. Derivados de aminoglicósidos para mejorar la afinidad de unión al ARN	48
1.2.6.2.2. Derivados de aminoglicósidos para vencer los fenómenos de resistencia	58
1.2.6.3. Perspectivas futuras	63
1.2.7. Estudios de reconocimiento molecular “in silico” de antibióticos aminoglicósidos con ARNr	64
2. Capítulo 2. Objetivos.	69
3. Capítulo 3. Guanidinio-glicósidos: Una nueva familia de aminoglicósidos.	75

3.1. Introducción	77
3.2. Antecedentes y objetivos.	95
3.2.1. Antecedentes	95
3.2.2. Objetivos.	100
3.2.3. Diseño y estrategia sintética.	115
3.3. Resultados y discusión	
3.3.1. Síntesis de los guanidino-glicósidos derivados de kanamicina A.	135
3.3.2. Estudios “ <i>in vitro</i> ” de los guanidinio-glicósidos 44 y 47-50 con enzimas modificadoras de aminoglicósidos.	147
3.3.3. Actividades “ <i>in vivo</i> ” con cepas resistentes y no resistentes a enzimas modificadoras de los guanidino-glicósidos 44 y 47-50 .	150
3.3.4. Estudios <i>in silico</i> de interacciones ligando-receptor	102
3.3.5. Síntesis de los guanidino-glicósidos derivados de gentamicina.	107
3.3.6. Actividades “ <i>in vivo</i> ” con cepas resistentes y no resistentes a enzimas modificadoras de los guanidino-glicósidos 70a y 70b	110
3.3.7. Estudios <i>in silico</i> de interacciones ligando-receptor.	112
3.4. Parte experimental.	116
3.4.1. Aspectos generales	116
3.4.1.1. Productos comerciales y disolventes	116
3.4.1.2. Instrumentación	118
3.4.2. Síntesis de 1,3,6',3''-tetra-guanidinio-kanamicina A, 44	120
3.4.3. Síntesis de 6',3''-di-guanidino-kanamicina A , 47	121
3.4.4. Síntesis de 1,3-Di-guanidino-kanamicina A, 48	124
3.4.5. Síntesis de 6'-Guanidinio-kanamicina A, 49	126
3.4.6. Síntesis de 3''-Guanidino-kanamicina A, 50	130
3.4.7. Síntesis de 3''-guanidinio gentamicina C1a (70a) y 3''-guanidinio gentamicina C2 (70b).	132

3.4.8 Medios de cultivo y soluciones.	135
3.4.9. Procedimiento para la Determinación de CIM.	136
3.4.10. Actividad enzimática.	136
3.4.11. Estudios computacionales para la determinación de la unión de aminoglicósidos con su diana biológica (ARNr) y con las enzimas de resistencia utilizando los programas AutoDock y Maestro.	138
4. Capítulo 4. Un nuevo 4,6-aminoglicósido para su unión selectiva al sitio 16S ARNr procariota.	143
4.1. Introducción	145
4.2. Antecedentes y objetivos.	146
4.2.1. Antecedentes	146
4.2.2. Objetivos.	152
4.3. Resultados y discusión.	155
4.3.1. Estudios <i>in silico</i> de interacciones ligando-receptor	155
4.3.2. Síntesis del pseudo-disacárido constituido por los anillos II y III del antibiótico natural kanamicina A, 83	158
4.3.3. Actividades “in vivo” de la kanamicina A, B y de sus fragmentos Neamina (anillos I y II) y 83 (anillos II y III).	170
4.3.4. Síntesis del aminoglicósido 84 derivado de xilosa.	171
4.3.5. Estudios “in Vitro” de los compuestos 83 y 84 con enzimas modificadoras de aminoglicósidos	178
4.3.6. Actividades “in vivo” con cepas resistentes y no resistentes a enzimas modificadoras del compuesto 84 .	181
4.4. Parte experimental	183
4.4.1. Síntesis de 6-O-(3-desoxi- α -D-3-amino-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina, 83	183
4.4.2. Síntesis de 4-O-(3-desoxi-3-amino- α -D-xilopiranosil)-6-O-(3-desoxi-3-amino- α -D-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina, 84	195
5. Capítulo 5. Conclusiones.	
6. Capítulo 6. Bibliografía.	



Capítulo 1

Introducción general

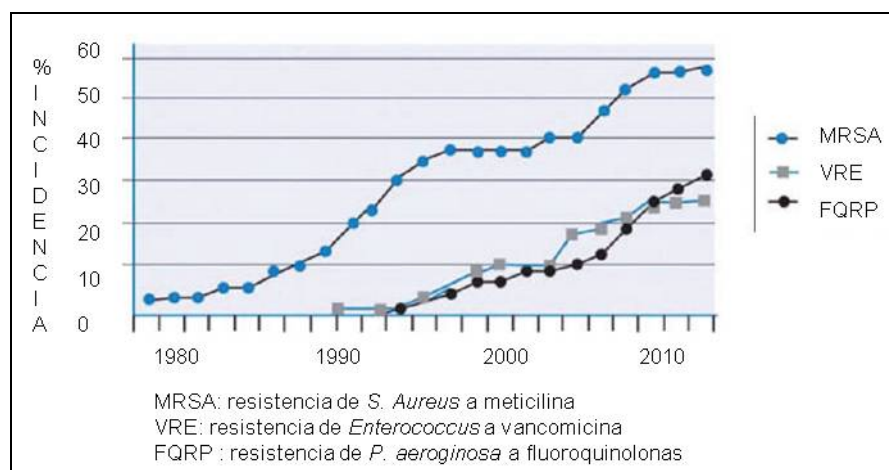
1.1.- Antibióticos

1.1.1. Introducción a la problemática actual

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diversos microorganismos o derivados sintéticos de los mismos, que suprimen la proliferación de otros gérmenes, generalmente bacterias. De la misma forma que existen múltiples especies de bacterias capaces de provocar enfermedades en personas y animales, existe una amplia variedad de antibióticos que actúan con cierto grado de selectividad frente a tales bacterias. Estos compuestos fueron llamados “drogas milagrosas” después de su descubrimiento en 1940. El objetivo terapéutico del antibiótico es ayudar al organismo en su lucha biológica frente a las bacterias causantes de la infección. Uno de los problemas más importantes que afecta a la salud pública de la mayoría de los países del mundo, es la creciente resistencia bacteriana. El incremento en la utilización de los antibióticos, su mal uso y otros factores relacionados han dado lugar, en las últimas décadas, a la emergencia de cepas resistentes.¹ Hay ejemplos de bacterias multi-resistentes a casi cualquier compuesto antibacteriano del mercado.

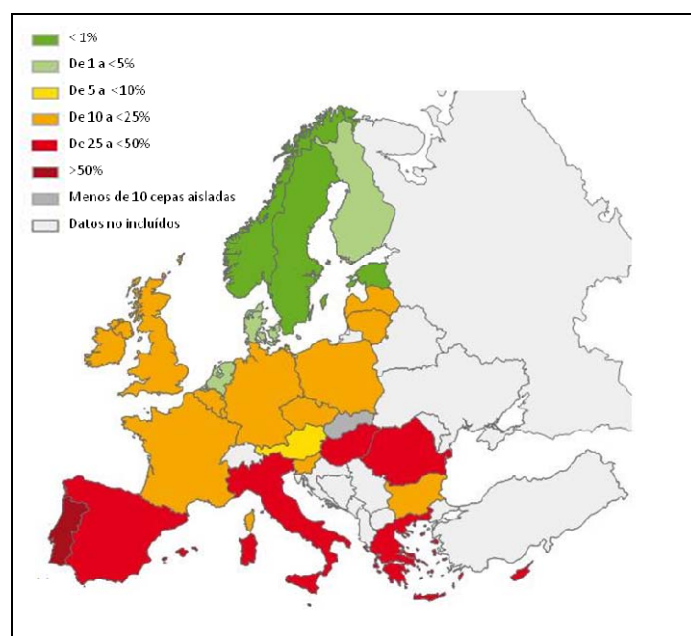
La prevalencia de patógenos resistentes a antibióticos disponibles continua creciendo anualmente (figura 1.1).²

Figura 1.1. Crecimiento de la incidencia de cepas resistentes en los últimos años.



En Europa, y tal como puede verse en la figura 1.2, existen varios países, entre los que se encuentra España, con niveles de resistencia mayores del 50%.

Figura 1.2.- Porcentaje de casos resistencia a antibióticos en las diferentes zonas de Europa.



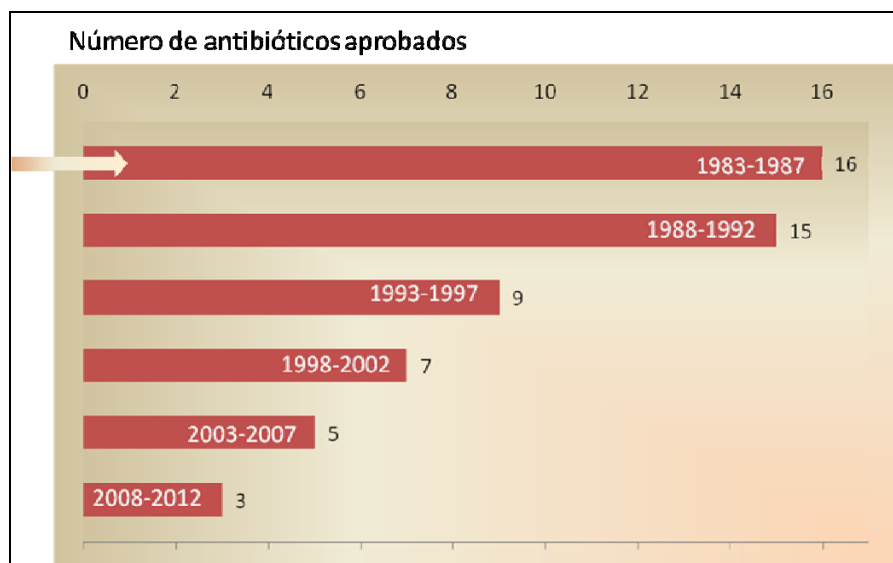
Este hecho es el responsable de que, según datos del Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades de la Unión Europea se estima que en Europa unos 400.000 pacientes adquieren anualmente una infección hospitalaria multi-resistente a la mayoría de antibióticos disponibles, de los cuales 25.000 mueren y cuyo tratamiento tiene un coste de 1.5 billones de euros.³

A esto hay que añadir que los informes de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Americana, IDSA, reflejan una disminución en los últimos 20 años en el número de antimicrobianos aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos Americana, FDA, (figura 1.3), con sólo 15 antibióticos aceptados desde 1998.⁴

Esto refleja la dificultad de desarrollar nuevos agentes y que la mayoría de programas de desarrollo de nuevos antibióticos de las principales compañías farmacéuticas finalizaron en la pasada década.^{2, 5} Esto se debe a razones tanto científicas como económicas.⁶

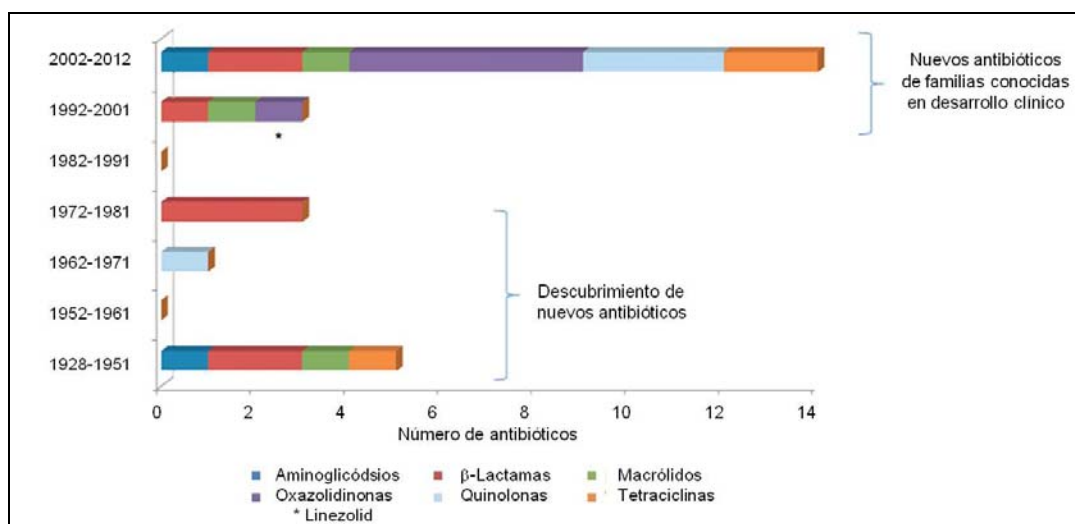
Desde un punto de vista científico uno de los principales problemas ha sido la falta de resultados en la identificación de cabezas de serie que sirvieran para el desarrollo de nuevas familias de antibióticos.⁷

Figura 1.3. Número de nuevos antibióticos aprobados por la FDA en periodos de cinco años desde 1983 hasta el pasado año.



Esto ha hecho que en la actualidad la mayoría de los antibióticos en desarrollo sean versiones de compuestos ya conocidos (figura 1.4).⁸

Figura 1.4. Antibióticos en desarrollo de familias conocidas.



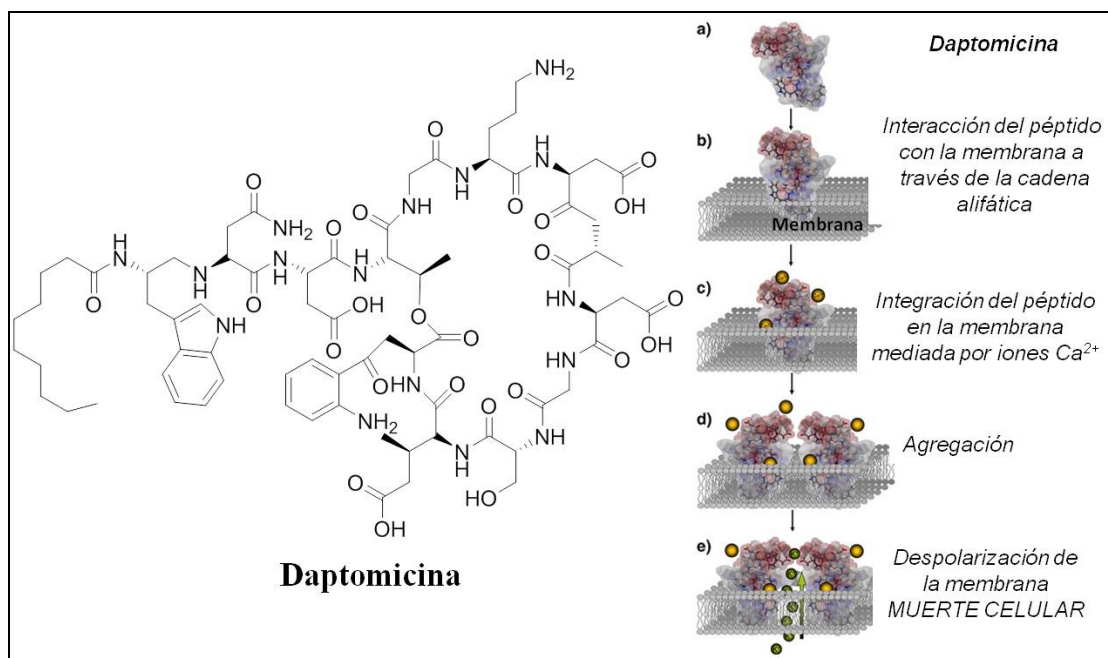
En lo que respecta a razones económicas los antibióticos tienen un alto coste en investigación y desarrollo, ya que el lanzamiento de un nuevo antibiótico puede suponer un gasto medio de quinientos mil dólares y una baja recuperación potencial del coste inicial, debido fundamentalmente que los tratamientos son cortos y a la pérdida de eficacia anticipada en el tiempo por la aparición de fenómenos de resistencia. De hecho, existen otras áreas en la industria farmacéutica mucho más productivas a la hora de

invertir en investigación y desarrollo, como es el caso, por ejemplo, de enfermedades crónicas, cardiología y oncología. A modo de ejemplo el tratamiento de un paciente con cáncer tiene un coste de entre treinta y ochenta mil dólares, mientras que en el caso de una infección éste no supera los doscientos.

Debido a este gran problema la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Americana ha propuesto unas recomendaciones para revitalizar la producción tanto privada como pública de estas drogas.⁹

Una de las estrategias que se pueden emplear para solucionar el problema de la resistencia es el desarrollo de nuevos compuestos antibacterianos que inhiban dianas bioquímicas de la bacteria desconocidas anteriormente o mediante mecanismos de acción diferentes a los conocidos hasta la fecha.¹⁰ A modo de ejemplo, la daptomicina (figura 1.5) es un compuesto natural con propiedades antibióticas frente a bacterias Gram-(+) que fue aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos Americana en el año 2003.¹¹

Figura 1.5. Estructura de la daptomicina y su mecanismo de acción.



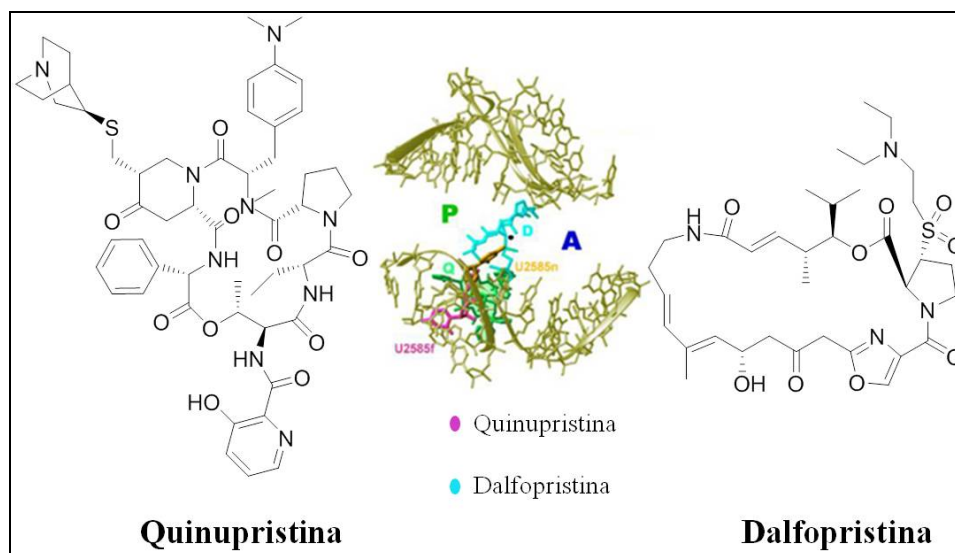
Se trata de un lipo-péptido que actúa a nivel de la membrana, con un mecanismo de acción distinto al de los antibióticos que ejercen su actividad sobre la misma diana. En líneas generales la daptomicina produce la ruptura de la membrana a través de la

formación de canales trans-membrana. Estos canales originan una fuga de los iones de la membrana, dando lugar a su despolarización y con ella a la muerte de la célula.¹²

Sin embargo hay que tener en cuenta que, aunque el descubrimiento de nuevos inhibidores y dianas puede ser un objetivo abordable, el desarrollo con éxito de nuevos agentes antibacterianos ha resultado ser tremendamente difícil.⁷

Otra opción para combatir el problema de la resistencia es la “terapia combinada”. La combinación de dos antibióticos, o antibióticos con adyuvantes se está convirtiendo en una aproximación terapéutica prometedora.¹³ Un ejemplo de esto es el caso de los antibióticos denominados estreptograminas. La combinación de dos de ellos, la quinupristina y la dalfopristina ejerce una acción como inhibidores de la síntesis proteica en la subunidad 50S del ribosoma, siendo necesaria la presencia de ambas moléculas.¹⁴ Esta sinergia es probablemente el resultado de una unión inicial de la dalfopristina al ribosoma, lo que provoca un cambio conformacional en la zona que facilita la unión de la quinupristina, inhibiendo la síntesis de proteínas (figura 1.6).

Figura 1.6. *Combinación de dos antibióticos como terapia combinada*



1.1.2. Aspectos generales y clasificación de los antibióticos.

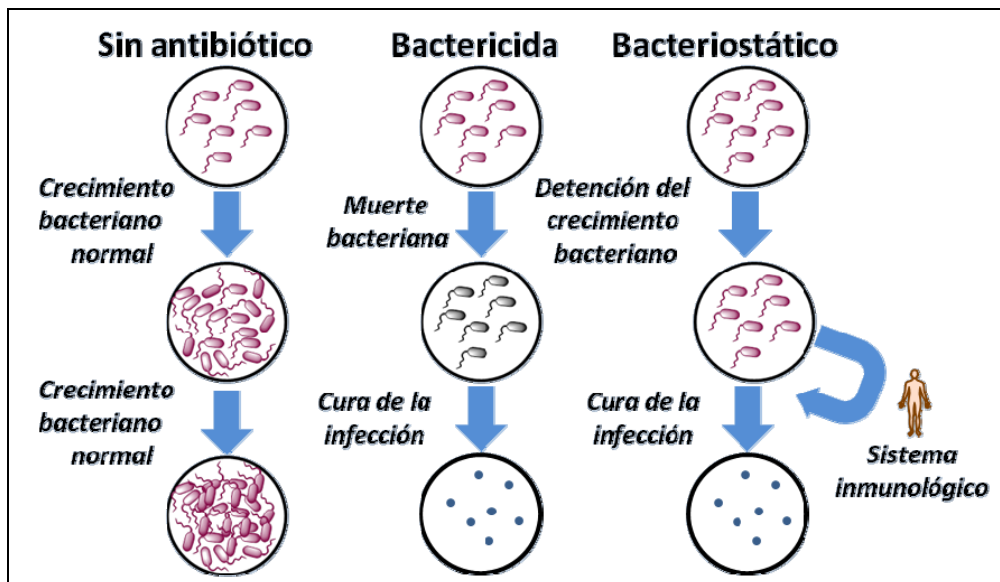
Al descubrimiento de la penicilina en cultivos de hongos por Alexander Fleming en 1929, le siguió el descubrimiento y uso clínico de las sulfonamidas por el premio Nobel Domgk en 1935.¹⁵ Durante la década de los 40 los antibióticos β -lactámicos revolucionaron la medicina, y se convirtieron en el factor más importante para aumentar

la esperanza de vida en la población mundial.¹⁶ Eran considerados “fármacos milagrosos”, ya que eliminaban las bacterias sin ocasionar un daño excesivo a las células eucariotas del individuo tratado.

Sin embargo, no fue hasta 1942 cuando Selman A. Waksman introdujo el término antibiótico, del griego anti (*contra*) y bios (*vida*), definiéndolo como “aquellas sustancias químicas producidas por microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos) que, a bajas concentraciones, inhiben el desarrollo o destruyen la vida de otros microorganismos”. Esta definición, que hacía referencia inicialmente a los antibióticos naturales se amplió para incluir moléculas semi-sintéticas, preparadas mediante modificación de éstas, y aquellas con actividad similar obtenidas por síntesis química, que habían sido llamadas inicialmente quimioterápicos.

Los antibióticos pueden actuar matando a las bacterias (bactericidas) o inhibiendo el desarrollo y multiplicación de los microorganismos pero sin destruirlos (bacteriostáticos), los cuales para erradicar la infección requieren del sistema inmunológico, como ocurre en el caso de las sulfamidas (figura 1.7).

Figura 1.7. Tipos de acción antibiótica



Los antibióticos se clasifican habitualmente según su diana y su mecanismo de acción, dividiéndose en tres grandes grupos (figura 1.8):¹⁷

1.1.2.1. *Aquellos que interfieren en la permeabilidad y biosíntesis de la pared celular:* (penicilinas, cefalosporinas, teicoplanina, antifúngicos, etc.)

1.1.2.2. *Aquellos que alteran la síntesis proteica bacteriana:*

(a) - *Inhiben la Subunidad 50S del ribosoma:* Cloroamfenicol, macrólidos, etc

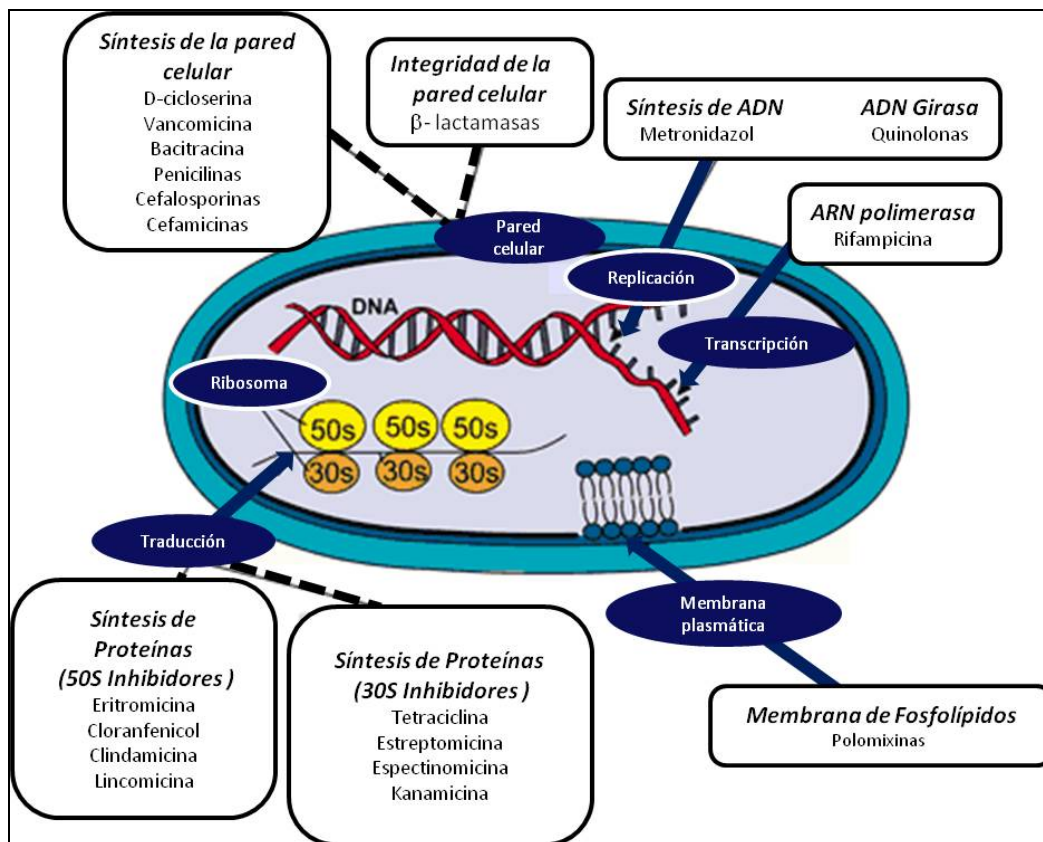
(b)-*Inhiben la Subunidad 30S del ribosoma:* Aminoglicósidos, tetraciclinas y espectinomina.

1.1.2.3. *Aquellos que afectan el Metabolismo de los ácidos nucleicos:*

(a)- *Inhiben la RNA Polimerasa:* Rifamicina.

(b)-*Inhiben la Topoisomerasa:* Quinolonas.

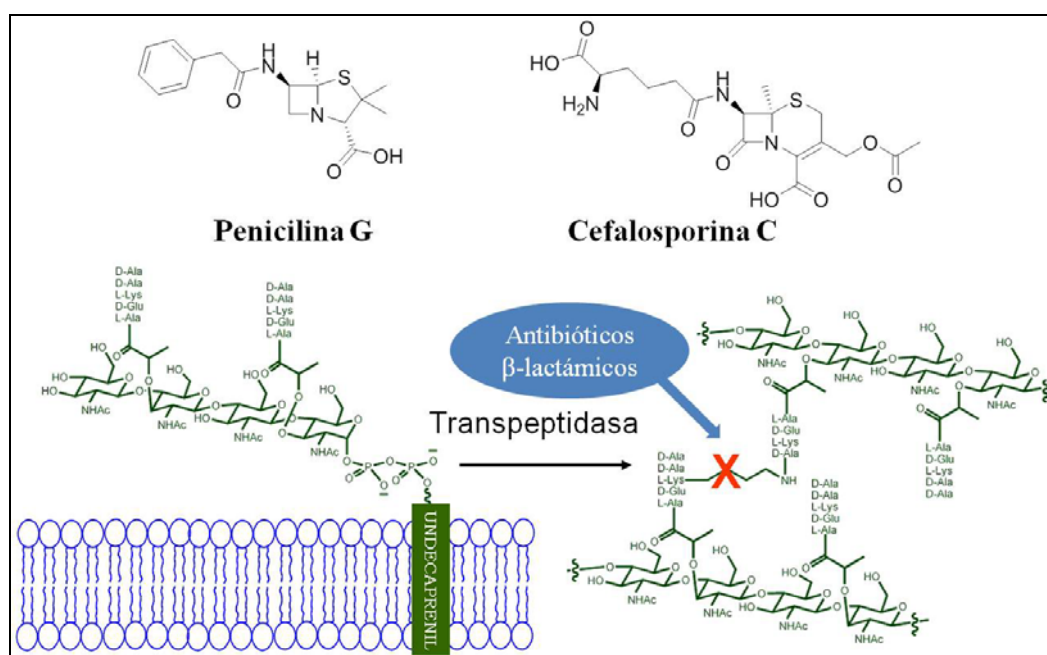
Figura 1.8. *Dianas y mecanismos de acción de los antibióticos sobre el microorganismo.*



1.1.2.1. Antibióticos que interfieren en la permeabilidad y biosíntesis de la pared celular.

La pared celular proporciona a la envuelta bacteriana la rigidez necesaria para sobrevivir en ambientes hipotónicos, además de conferir a la bacteria su forma característica. Está compuesta por una serie de polisacáridos y de polipéptidos que forman el peptidoglicano o mureína. Debido a la importancia de la pared celular para la viabilidad de la bacteria y a que no existe su homólogo en células eucariotas, los antibióticos que desestabilizan su integridad se han utilizado en clínica durante décadas. Entre ellos destacan los β -lactámicos: penicilinas y cefalosporinas (figura 1.9), cuya diana de acción es un enzima con actividad transpeptidasa que se encarga de alargar la cadena de peptidoglicano (figura 1.9).¹⁸ Como resultado de la acción del antibiótico, la capa de peptidoglicano se vuelve más débil y susceptible a lisis frente a cambios de la presión osmótica.

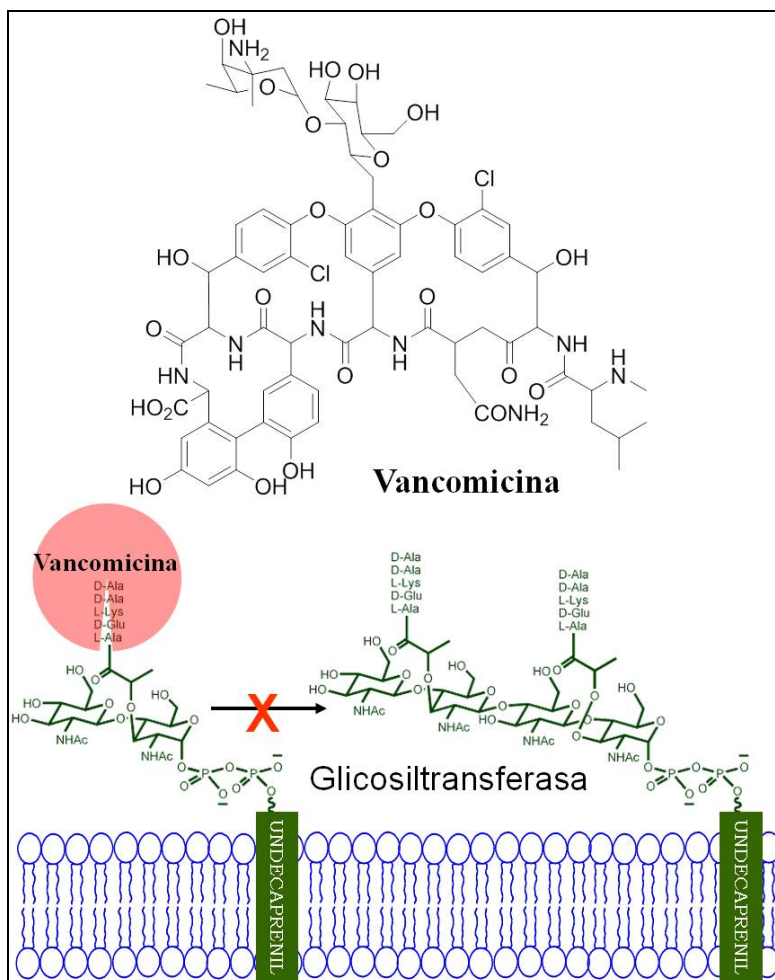
Figura 1.9. Estructura de la penicilina G, cefalosporina C y mecanismo de acción



Además de las penicilinas y cefalosporinas, la vancomicina (figura 1.10), perteneciente al grupo de los antibióticos de tipo glico-peptídico, actúa sobre la pared celular secuestrando los péptidos que ejercen como sustratos de enzimas transpeptidasas y transglicosilasas (figura 1.9),¹⁹ por lo que el ensamblaje del peptidoglicano es

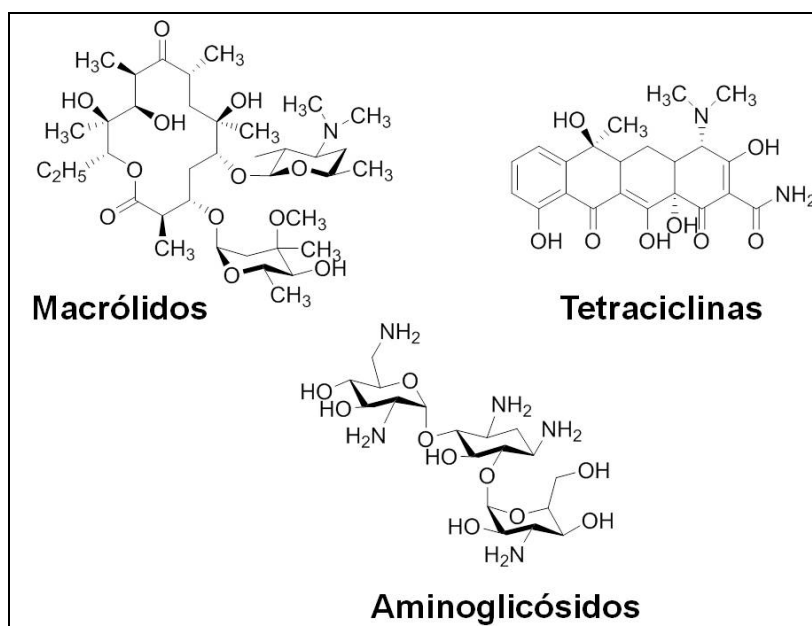
defectuoso. La acción combinada de β -lactámicos y vancomicina produce un efecto sinérgico, ya que ambos actúan sobre pasos consecutivos (enzima y sustrato).

Figura 1.10. Estructura de la vancomicina y mecanismo de acción

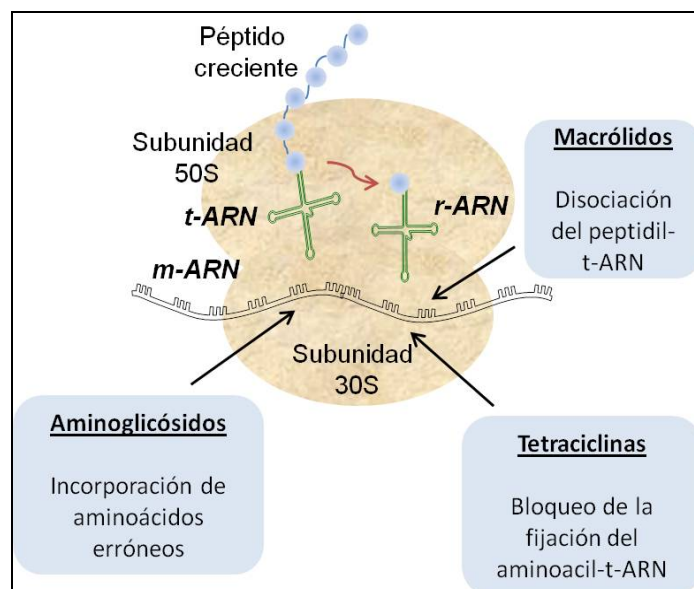


1.1.2.2. Antibióticos que alteran la síntesis proteica

La maquinaria traduccional procariota es la diana de la mayoría de antibióticos. Probablemente esto sea debido a la complejidad del ribosoma, que lo hace vulnerable en muchos aspectos, además de ser lo suficientemente distinto de su análogo eucariota. Los antibióticos que actúan a este nivel son los macrólidos,²⁰ las tetraciclinas²¹ y los aminoglicósidos²² (figura 1.11).

Figura 1.11. Estructura de los macrólidos, tetraciclinas y aminoglicósidos

Los macrólidos estimulan la disociación del peptidil-ARNt del ribosoma durante la translocación, por lo que la cadena polipeptídica naciente deja de elongarse prematuramente (figura 1.12).

Figura 1.12. Mecanismo de acción de los antibióticos que inhiben la síntesis proteica

Las tetraciclinas se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano bloqueando la fijación del aminoacil-ARNt al sitio aceptor del complejo formado por el ARNm y la subunidad 50S del ribosoma, mientras que la unión de los aminoglicósidos al ribosoma

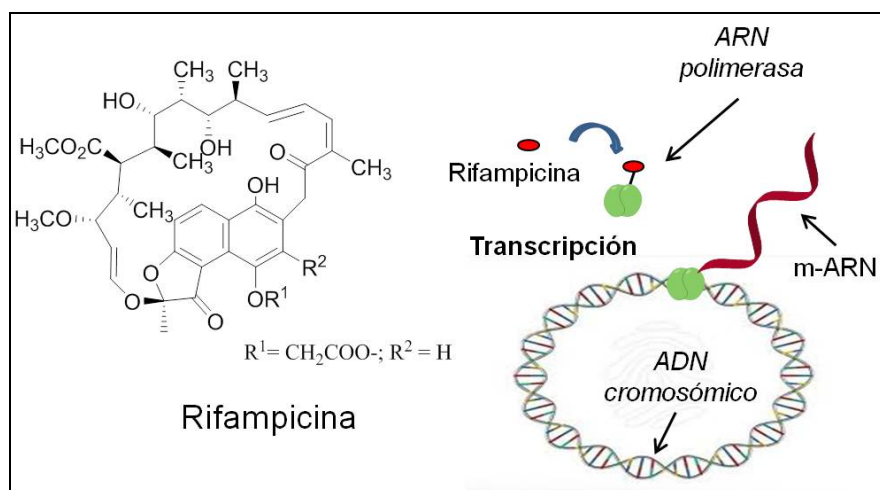
provoca la incorporación de aminoácidos incorrectos en la cadena polipeptídica naciente, dando lugar a proteínas erróneas que se acumulan en la membrana celular, induciendo la muerte de la bacteria (figura 1.12).

1.1.2.3. Antibióticos que afectan al metabolismo de los ácidos nucleicos

(a) Inhibidores de la ARN Polimerasa: Rifampicina

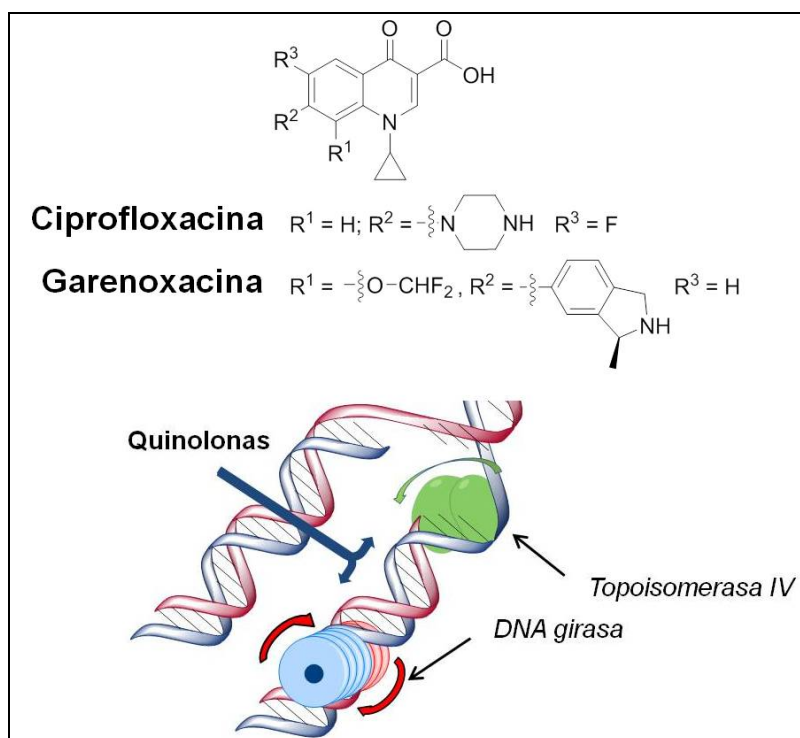
Las rifampicinas (figura 1.13) son antibióticos sintéticos que inhiben la síntesis de ARN dependiente de ADN, debido a la unión de éstas a la subunidad β de la ARN polimerasa de las células procariotas.²³

Figura 1.13. Estructura de la rifampicina y mecanismo de acción.



(b) Inhibidores de la Topoisomerasa: Quinolonas

Las quinolonas (figura 1.14) inhiben la síntesis del ADN, promoviendo una ruptura del mismo a nivel de los complejos ADN-girasa o ADN-topoisomerasa IV, provocando de una manera rápida la muerte de la bacteria. Como regla general, se sabe que la actividad de estos antibióticos sobre bacterias Gram-(-) se debe a la inhibición de la ADN-girasa, mientras que en el caso de Gram-(+) la enzima inhibida es la IV-topoisomerasa.²⁴

Figura 1.14. Estructura de las quinolonas y mecanismo de acción.

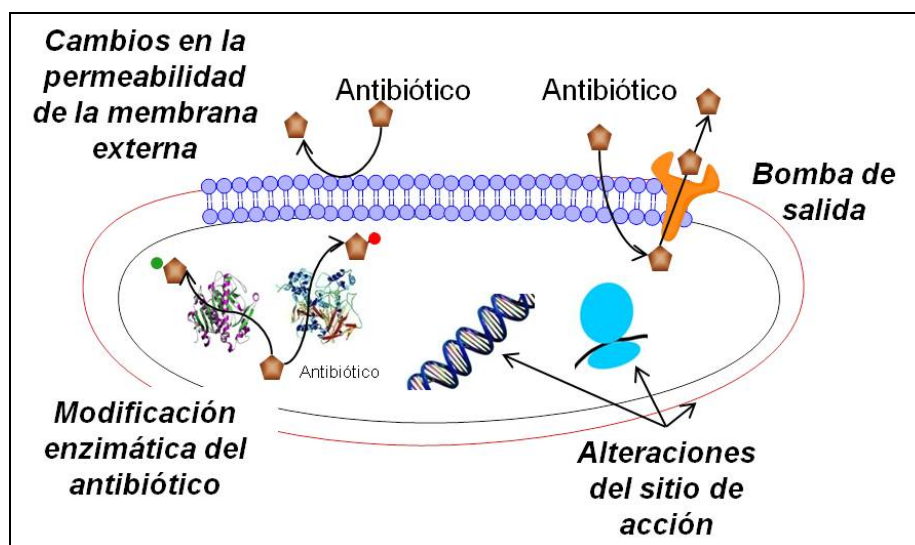
1.1.3. Mecanismos de resistencia en antibióticos

Los mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico son cuatro: modificación enzimática del antibiótico, bombas de salida, cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alteraciones del sitio de acción (figura 1.15).^{25, 26}

1.1.3.1. Modificación enzimática del antibiótico

Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad.²⁷ Un ejemplo muy característico y prevalente son las β -lactamasas, proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia.²⁸ De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglicósidos que son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación tal como queda descrito en el apartado 1.2.4 de esta Memoria.²⁹

Figura 1.15. Mecanismos generales de resistencia bacteriana.



1.1.3.2. Bombas de salida

Operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción.³⁰ Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram-(-).

1.1.3.3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico.³¹

1.1.3.4. Alteraciones del sitio de acción

Las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta.³² Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram-(+), las cuales, por ejemplo, generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas.

1.2.- Antibióticos aminoglicósidos

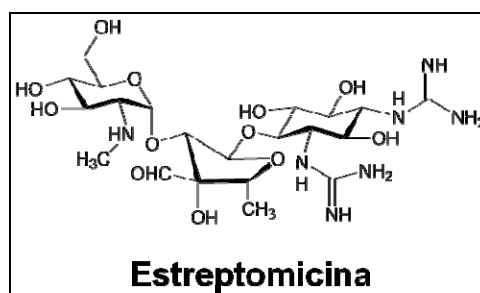
1.2.1. Introducción y evolución histórica

Los aminoglicósidos son un grupo de antibióticos de origen natural, obtenidos a partir de cultivos de *Streptomyces*, o semisintéticos utilizados en clínica desde hace más de 50 años. Entre sus ventajas destaca su actividad antibacteriana de amplio espectro, es decir sobre bacterias Gram-(+) y Gram-(-) y sus predecibles propiedades farmacocinéticas. Como desventajas principales cabe mencionar su inactividad por vía oral (su administración preferente es por inyección o por vía tópica) y la existencia de efectos tóxicos en el oído interno (ototoxicidad), riñones (nefrotoxicidad) y a nivel muscular.

Los aminoglicósidos se aislaron por primera vez de muestras de suelo a partir de diversas especies de *Micromonospora* y *Streptomyces*.³³

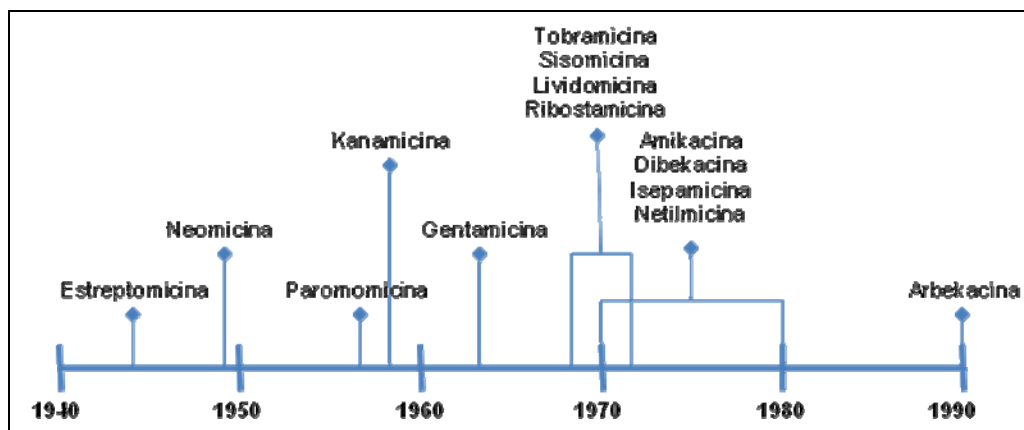
La estreptomycinina fue el primer aminoglicósido descubierto en 1944 por Waksman y colaboradores a partir de un cribado sistemático de sobrenadantes de cultivos bacterianos buscando actividad inhibitoria frente a *Mycobacterium tuberculosis* (figura 1.16).³⁴ Esta molécula resultó ser el primer agente efectivo en el tratamiento de la tuberculosis y, después de la penicilina, el segundo compuesto de esta clase empleado en terapia. Sin embargo, unos años después de su introducción en quimioterapia antibacteriana humana, comenzaron a detectarse microorganismos resistentes a estreptomycinina.

Figura 1.16. Estructura química de la estreptomycinina



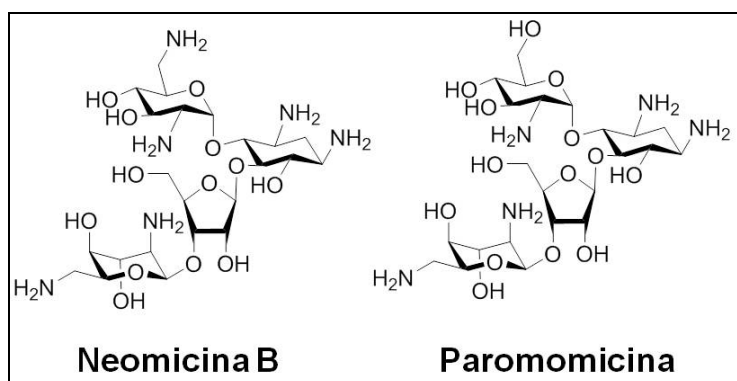
Por este motivo comenzó la búsqueda de nuevos compuestos de tipo aminoglicósidos lo que llevó al descubrimiento de una nueva generación de aminoglicósidos derivados de la 2-DOS (figura 1.17).

Figura 1.17. Diagrama histórico del descubrimiento de los aminoglicósidos

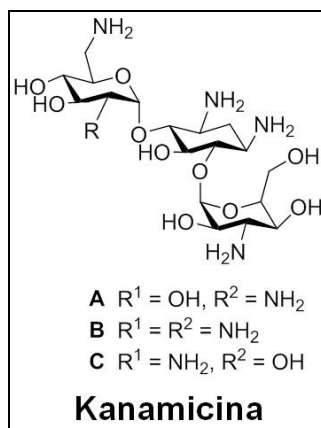


Así, la neomicina fue descubierta en paralelo por los grupos de Waksman y Umezawa en 1949 (figura 1.18).³⁴⁻³⁵ La neomicina B se ha usado específicamente como aplicación tópica debido a su pobre biodisponibilidad oral y penetración celular. Además su alta ototoxicidad ha limitado su aplicación clínica. Años más tarde, en 1956, se descubrió un análogo de la neomicina B, la paromomicina, pero no era lo suficientemente potente como para darle un uso sistémico (figura 1.18).³⁶

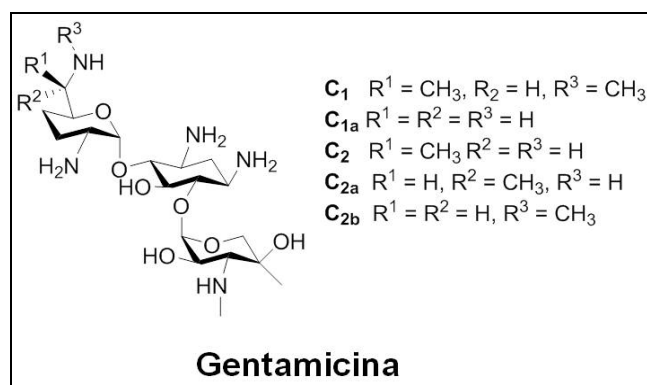
Figura 1.18. Estructura química de la neomicina B y de la paromomicina



La situación cambió en 1957 con el descubrimiento de la familia de las kanamicinas (A, B y C) por parte del grupo de Umezawa (figura 1.19).³⁷ Estos aminoglicósidos, producidos por *Streptomyces kanamyceticus*, resultaron ser antibióticos bien tolerados por vía parenteral a pesar de no ser completamente inocuos, y se han usado ampliamente en infecciones causadas por bacterias resistentes, incluyendo aquellas resistentes a estreptomicina. Sin embargo, debido a su uso extendido, en 1965 comenzaron a aparecer las primeras cepas resistentes.³⁸

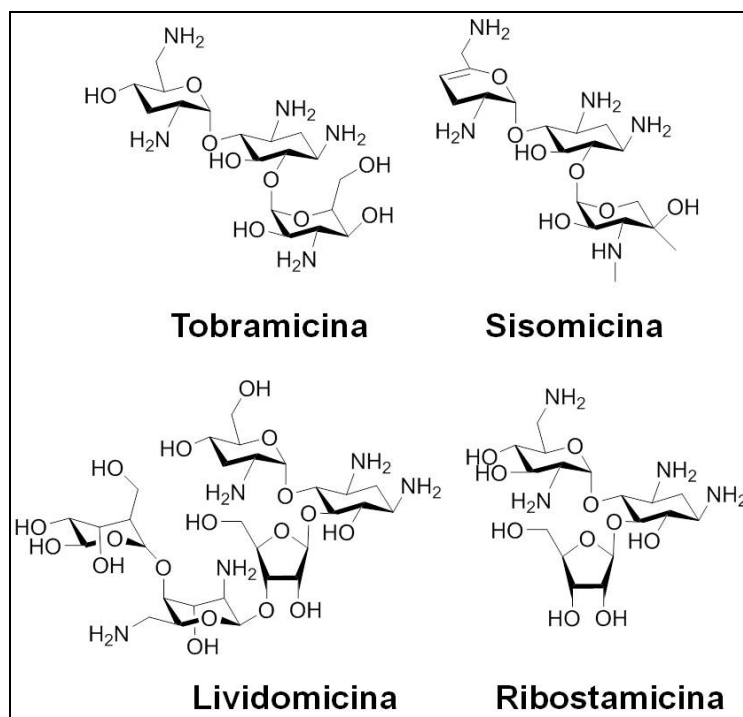
Figura 1.19. Estructura química de la familia de antibióticos kanamicina

La familia de antibióticos denominados gentamicina (C1, C1a, C2, C2a y C2b) (figura 1.20) fue aislada de *Micromonospora* en 1963 por Weinstein y colaboradores y constituyó un avance significativo en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram(-), siendo muy activa frente a éstas, y muy bien tolerada.³⁹

Figura 1.20. Estructura química de la familia de gentamicinas

El éxito en clínica de éstos, propició la búsqueda de antibióticos similares, como la tobramicina, sisomicina, lividomicina y ribostamicina durante el periodo de 1968 a 1972 (figura 1.21).⁴⁰

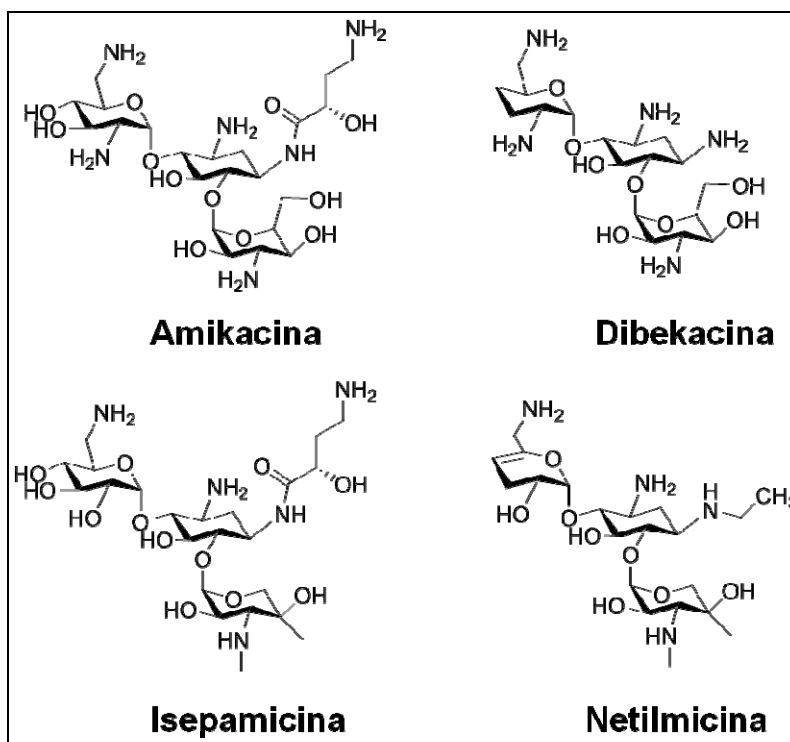
Figura 1.21. Estructura química de la tobramicina, sisomicina, lividomicina y ribostamicina



De todos ellos, sólo la tobramicina y la sisomicina se han usado en terapia clínica. Poseen un espectro de acción similar al de las gentamicinas, resultando incluso más activos frente a algunas cepas bacterianas, como por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*.

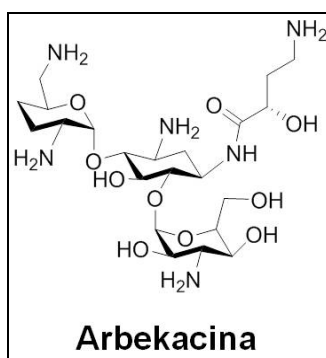
Los antibióticos semisintéticos amikacina (derivado de la kanamicina A), dibekacina (derivado de la kanamicina B), isepamicina (derivado de la gentamicina B) y netilmicina (derivado de la sisomicina) se introdujeron durante la década de los 70 para tratar de evitar los problemas de resistencia bacteriana originados por el uso de los correspondientes antibióticos naturales (figura 1.22).⁴¹

Figura 1.22. Estructura química de la amikacina, dibekacina, isepamicina y netilmicina



Finalmente, la arbekacina (figura 1.23), un derivado de la kanamicina B utilizado en Japón desde 1990, es el aminoglicósido más reciente introducido en clínica.⁴²

Figura 1.23. Estructura química de la arbekacina

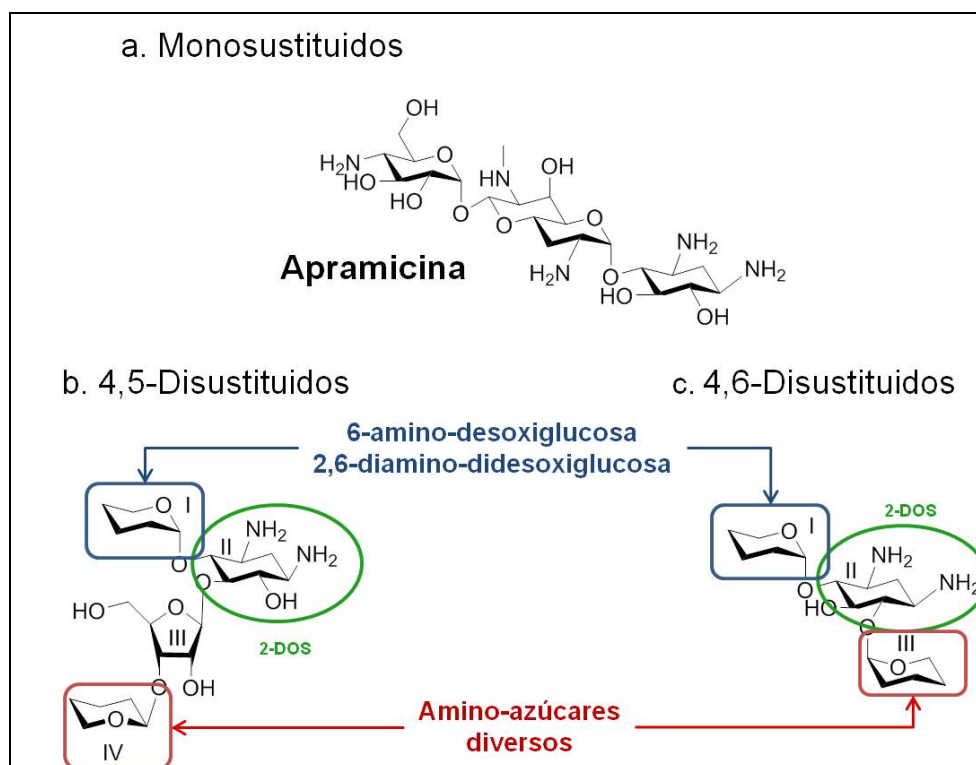


1.2.2. Características estructurales de los aminoglicósidos

Los aminoglicósidos poseen, en general, un esqueleto estructural consistente en un anillo de tipo aminociclitol saturado con sustituciones de tipo hidroxilo y amino, conectado a través de enlaces glicosídicos 1,2-*cis* a varios amino-azúcares. Muy frecuentemente éstos son de tipo 6-amino-desoxi o 2,6-diamino-di-desoxi-glucosas, en ocasiones desoxigenados o N- y/o C-metilados. En ocasiones, además, se han identificado anillos adicionales o carbohidratos no usuales en la estructura de algunos aminoglicósidos. Sin embargo, el hecho característico, en lo que a estructura se refiere en este tipo de compuestos, es la presencia, en la mayoría de los aminoglicósidos usados en clínica, de la 2-DOS como aminociclitol, que se encuentra sustituida por los amino-azúcares.

Aunque se ha encontrado algún derivado en el que ésta se encuentra monosustituida, como por ejemplo la apramicina (figura 1.24a), lo más normal es que esté disustituida o bien en las posiciones relativas 4,5 (como por ejemplo en la neomicina, paromomicina y ribostamicina) (figura 1.24b), o bien en las 4,6 (como por ejemplo las kanamicinas y tobramicina entre otros) (figura 1.24c).

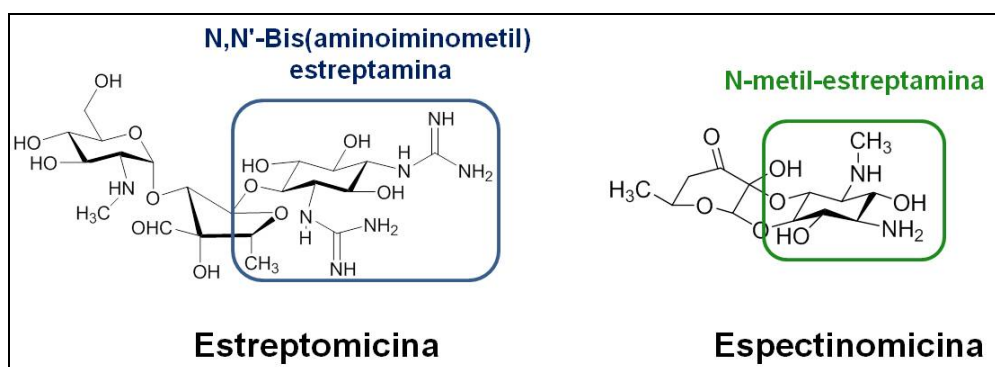
Figura 1.24. Estructura general de los aminoglicósidos derivados de 2-DOS



En la nomenclatura actual, el anillo que está unido a la posición 4 de la 2-DOS, se nombra como anillo I, y el anillo III es el otro amino-azúcar unido a la posición 5 ó 6 del anillo II. El anillo IV se corresponde con cualquier anillo adicional unido al anillo III.⁴³

Como excepción a estos aminoglicósidos cabe destacar aquellos en los cuales el aminociclitol es una estreptamina, como es el caso de la estreptomina, que además contiene guanidinos en vez de aminos en este anillo, y la espectinomicina, en la cual la N-metil-estreptamina se encuentra fusionada a un ciclitol a través de un enlace glicosídico y otro de tipo hemiacetal (figura 1.25).

Figura 1.25. Antibióticos derivados de la estreptamina



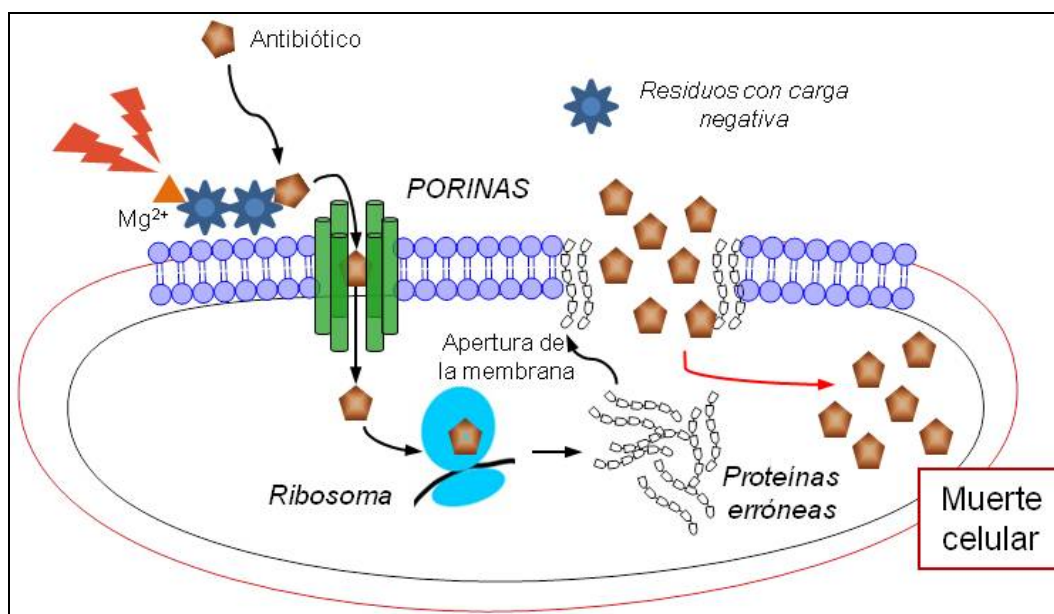
La estructura química de los aminoglicósidos es fundamental a la hora de entender sus propiedades. Son compuestos básicos, muy solubles en agua y altamente polares debido al número elevado de grupos funcionales amino e hidroxilo que poseen. Los grupos amino se encuentran mayoritariamente protonados a pH fisiológico, lo que les confiere carácter policationico que contribuye a su actividad antibacteriana. Debido a su carga positiva, son capaces de unirse al lipopolisacárido cargado negativamente de la pared bacteriana de especies Gram(-) y a una variedad de moléculas aniónicas intracelulares y de la membrana celular, como el ADN, ARN y fosfolípidos. Sin embargo, su carga positiva a pH fisiológico también contribuye a su toxicidad (ototoxicidad, nefrotoxicidad y bloqueo neuromuscular). Los aminoglicósidos son compuestos metabólicamente estables que son eliminados inalterados en orina.⁴⁴

1.2.3.-Mecanismo de acción

La actividad bactericida de los antibióticos aminoglicósidos se debe a la unión al ribosoma bacteriano, ocasionando la síntesis de proteínas erróneas que se acumulan en la membrana celular, produciendo una alteración en su integridad y, en último término, la muerte celular.⁴⁵ A pesar del gran progreso que se ha realizado en los últimos años en elucidar los detalles de la interacción de los antibióticos aminoglicósidos con el ribosoma y su consecuente influencia en la maquinaria traduccional, existen aún muchos aspectos desconocidos de la interacción del aminoglicósido y la célula bacteriana.

Se ha propuesto que los antibióticos aminoglicósidos penetran en bacterias aerobias en varios pasos consecutivos (figura 1.26).⁴⁶

Figura 1.26. Mecanismo de acción global del aminoglicósido



En primer lugar, los antibióticos aminoglicósidos se unen electrostáticamente a residuos cargados negativamente de la membrana externa bacteriana. En el caso de bacterias Gram(-), se unen a fosfolípidos y lipopolisacáridos y en el de Gram(+), a fosfolípidos y ácidos teicoicos.^{46c} Este proceso es pasivo, es decir, no-dependiente de energía.⁴⁷ Se cree que la unión de los aminoglicósidos da lugar a un desplazamiento de los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} que unen las moléculas de lipopolisacárido adyacentes, ocasionando un daño en la membrana externa y aumentando su permeabilidad.⁴⁸ Los

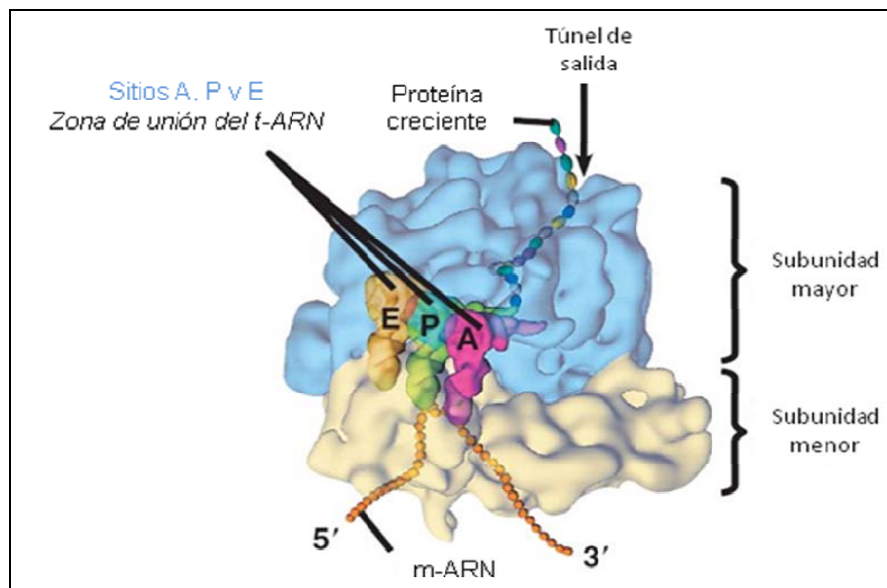
antibióticos aminoglicósidos difunden a través de canales de porina presentes en la membrana externa y entran en el espacio periplásmico. Para que se dé el transporte a través de la membrana citoplasmática se requiere energía procedente de la cadena de transporte de electrones en un proceso dependiente de oxígeno, por lo que a esta fase se le ha denominado Fase Dependiente de Energía I (FDE-I). Esto explicaría el por qué microorganismos deficientes en sistemas de transporte de electrones, como los anaerobios, son resistentes a los antibióticos aminoglicósidos.⁴⁹ Durante la FDE-I, sólo una cantidad baja de antibiótico atraviesa la membrana citoplasmática.⁵⁰ La unión de los aminoglicósidos al ribosoma, tal como se detalla en la sección 1.2.3.1, da lugar a fallos en el proceso de traducción del ARNm, produciendo proteínas aberrantes. Algunas de estas proteínas son incorporadas en la membrana citoplasmática, dando lugar a la pérdida de su integridad. Este suceso desencadena una serie de acontecimientos que se denominan Fase Dependiente de Energía II (FDE-II).⁵¹ En ella, más cantidad de antibiótico aminoglicósido es transportado a través de la membrana plasmática dañada. Como consecuencia, el antibiótico se acumula rápidamente en el citoplasma saturando los ribosomas y provocando la muerte celular.⁵²

1.2.3.1. Interacción de los antibióticos con el ribosoma bacteriano

La diana biológica concreta de los antibióticos aminoglicósidos se localiza en el denominado sitio A (sitio de unión del aminoacil-ARNt) de la subunidad ribosómica 16S (figura 1.27).⁵³ Esta región del ribosoma juega un papel fundamental en el proceso de traducción.⁵⁴

Durante la traducción, el ARNm forma un par codón-anticodón con el aminoacil ARNt portador del aminoácido a incorporar en la cadena polipeptídica naciente. El ARNm y el ARNt interaccionan formando una mini-hélice de tres pares de bases con apareamiento tipo Watson-Crick (etapa 1, figura 1.28). Como es lógico, aquellos pares codón-anticodón que no presenten la complementariedad adecuada darán lugar a un complejo significativamente menos estable que aquellos que presenten una complementariedad total, lo que contribuye a la fidelidad del proceso de traducción. Sin embargo, este mecanismo por sí solo, no es capaz de garantizar una fidelidad suficiente.

Figura 1.27. Estructura tridimensional del ribosoma y zonas claves en la unión del aminoglicósido

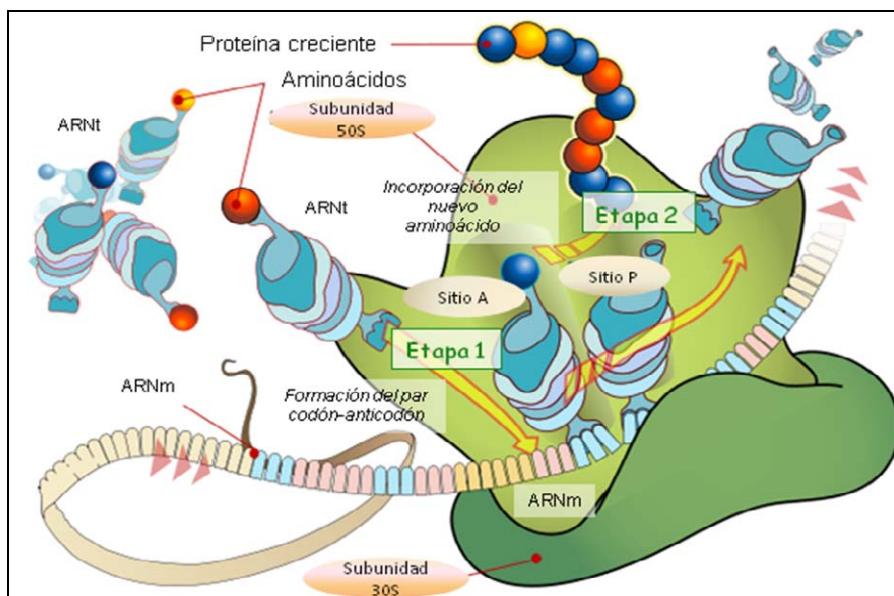


De hecho, si la fidelidad del proceso de traducción se apoyase exclusivamente en criterios energéticos como el anteriormente expuesto, la tasa de errores introducidos en la traducción sería muy superior a la observada experimentalmente. Existen, por lo tanto, mecanismos adicionales para asegurar la correcta traducción de la información contenida en el ARNm. El sitio A forma parte del mecanismo fundamental de verificación de errores del ribosoma y tiene, como principal función, evitar la introducción de aminoácidos incorrectos en la cadena polipeptídica naciente (etapa 2, figura 1.28).

Sin embargo, en presencia del antibiótico aminoglicósido, tiene lugar, tal como se ha comentado anteriormente la síntesis de proteínas erróneas, lo que da lugar a la muerte de la célula. Ya en el año 1964 el grupo de Davies sugirió que la estreptomicina podría interferir en la biosíntesis de proteínas, al interactuar con el complejo ribosoma-ARNm, alterando el proceso de traducción.⁵⁵ Estudios posteriores pusieron de manifiesto que los antibióticos aminoglicósidos alteran la síntesis proteica al inducir fallos en la lectura del codón e inhibiendo la translocación (figura 1.28).⁵⁶ Años más tarde Moazed y Noller mostraron que la neomicina y aminoglicósidos relacionados se unían a secuencias conservadas filogenéticamente del ARNr 16S, que forma parte de los sitios de unión aminoacil-ARNt (sitio A) y peptidil-ARNt (sitio P) en la subunidad ribosomal 30S.^{53, 57} También se llevaron a cabo experimentos de modificación química

en el ribosoma que indicaban que los aminoglicósidos de la familia de la neomicina protegen los nucleótidos del sitio A de la reacción con sondas químicas.⁵⁸

Figura 1.28. Síntesis de proteínas en el ribosoma



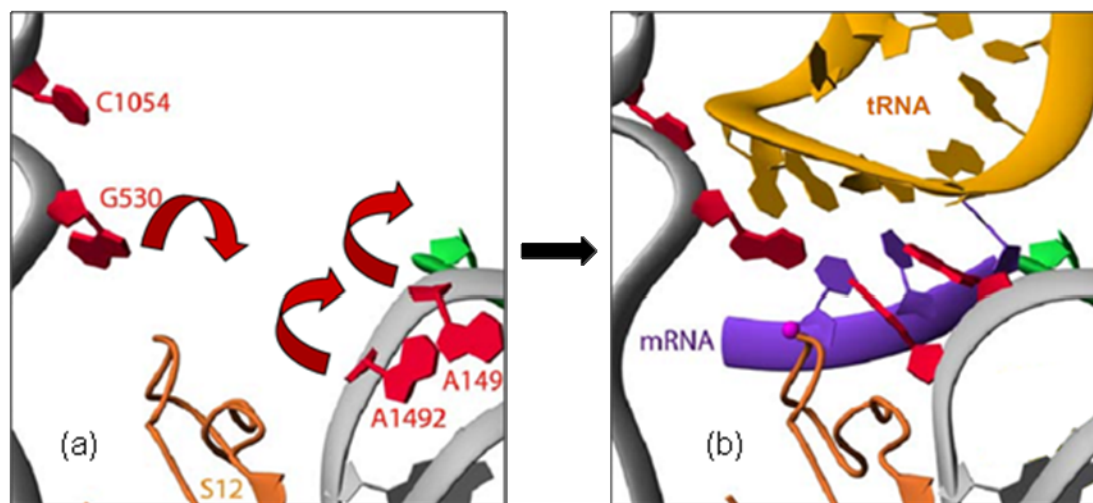
Sin embargo, en presencia del antibiótico aminoglicósido, tiene lugar, tal como se ha comentado anteriormente la síntesis de proteínas erróneas, lo que da lugar a la muerte de la célula. Ya en el año 1964 el grupo de Davies sugirió que la estreptomicina podría interferir en la biosíntesis de proteínas, al interactuar con el complejo ribosoma-ARNm, alterando el proceso de traducción.⁵⁵ Estudios posteriores pusieron de manifiesto que los antibióticos aminoglicósidos alteran la síntesis proteica al inducir fallos en la lectura del codón e inhibiendo la translocación (figura 1.28).⁵⁶ Años más tarde Moazed y Noller mostraron que la neomicina y aminoglicósidos relacionados se unían a secuencias conservadas filogenéticamente del ARNr 16S, que forma parte de los sitios de unión aminoacil-ARNt (sitio A) y peptidil-ARNt (sitio P) en la subunidad ribosomal 30S.^{53, 57} También se llevaron a cabo experimentos de modificación química en el ribosoma que indicaban que los aminoglicósidos de la familia de la neomicina protegen los nucleótidos del sitio A de la reacción con sondas químicas.⁵⁸

Sin embargo, la verdadera comprensión a nivel estructural de cómo ejercen su acción estos compuestos llegó con la descripción biofísica de los complejos de diversos antibióticos con el ARNr, su diana biológica. En 1996 se describió la estructura en disolución correspondiente al complejo entre el sitio A y la paromomicina.⁵⁹

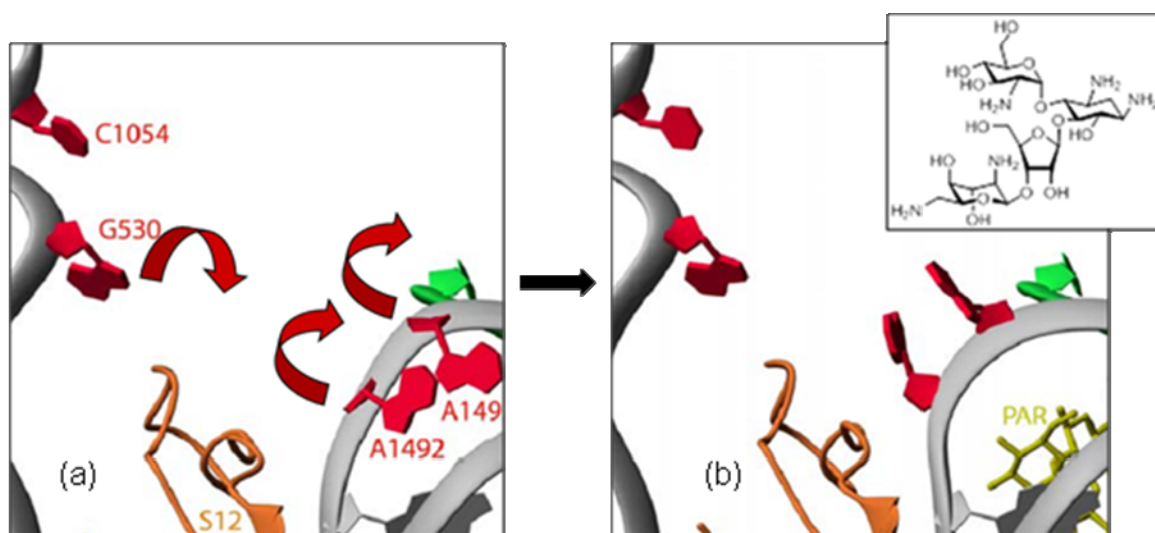
Posteriormente, en el año 1998 se determinó la estructura del complejo entre la misma diana y la gentamicina.⁶⁰ En el año 2000, se resolvieron con métodos de difracción de rayos-X dos estructuras cristalográficas de la subunidad ribosomal 30S del microorganismo *Thermus thermophilus* a una resolución de 3.3 Å y 3 Å respectivamente,⁶¹ y otra procedente del microorganismo *Haloarcula marismortui* a una resolución de 2.4 Å.⁶² Así mismo, se resolvió la estructura de la subunidad 30S en complejo con los antibióticos estreptomicina, paromomicina y espectinomicina.⁶³ Todos estos estudios junto con las estructuras conocidas de los constituyentes del ribosoma obtenidos por resonancia magnética nuclear,⁶⁴ ofrecen una información muy valiosa del proceso de traducción y de los mecanismos moleculares de acción, incluyendo las características de afinidad y especificidad de la interacción aminoglicósido-ribosoma bacteriano. En los últimos años, otros complejos aminoglicósido-sitio A han sido descritos mediante difracción de rayos-X.⁶⁵

La región clave del sitio A, en lo referente a la acción biológica de los aminoglicósidos, se localiza entre los nucleótidos en posiciones 1400-1410 y 1490-1500. Esta porción de ARN está constituida por un giro interno asimétrico, flanqueado por dos porciones de doble hélice.^{65a} Las adeninas 1492 y 1493, localizadas en el giro interno, juegan un papel fundamental en el proceso de verificación de errores.^{58a, 66} Estos residuos se encuentran inicialmente en el interior de la doble hélice de ARN (figura 1.29a). Sin embargo, en presencia de un par codón-anticodón correcto, el sitio A experimenta un cambio conformacional significativo en el que los residuos A1492 y A1493 se orientan fuera de la doble hélice e interaccionan con el surco menor de la mini hélice de tres pares de bases constituida por el par codón-anticodón (figura 1.29b).⁶⁷ Este cambio conformacional estabiliza el complejo y permite que el proceso de traducción siga su curso.⁶⁸

Por el contrario, si el par codón-anticodón no tiene la complementariedad correcta, su interacción con los residuos de adenina previamente mencionados será defectuosa. Por lo tanto, el cambio conformacional en el sitio A no se produce y el aminoácido que porta el ARNt no se incorpora en el polipéptido naciente.

Figura 1.29. (a) Sitio A en su estado libre y (b) en presencia de un par codón-anticodón

Los estudios estructurales realizados hasta la fecha demuestran que los antibióticos aminoglicósidos se unen al sitio A induciendo en éste un cambio conformacional análogo al observado en presencia de un par codón-anticodón correcto. Así, el antibiótico se inserta en el surco mayor del ARN (figura 1.30a) desplazando los residuos A1492 y A1493, que quedan expuestos en la zona exterior de la hélice (figura 1.30b).

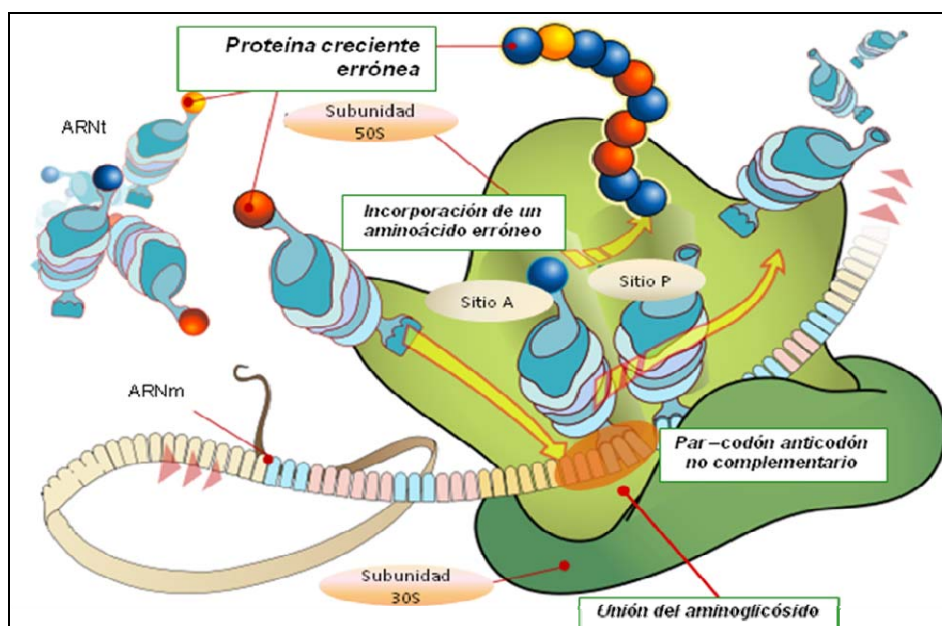
Figura 1.30. (a) Sitio A en su estado libre y (b) en presencia de paromomicina

Como consecuencia de la interacción con el antibiótico, el ARN adopta una conformación de alta afinidad por el complejo codón-anticodón. Esto disminuye su

capacidad de discriminar los pares codón-anticodón correctos de los incorrectos lo que afecta a la fidelidad del proceso de traducción.^{68a, 69}

A modo de resumen, en la figura 1.31 se muestra de un modo esquemático el mecanismo de acción de los aminoglicósidos en el sitio A.

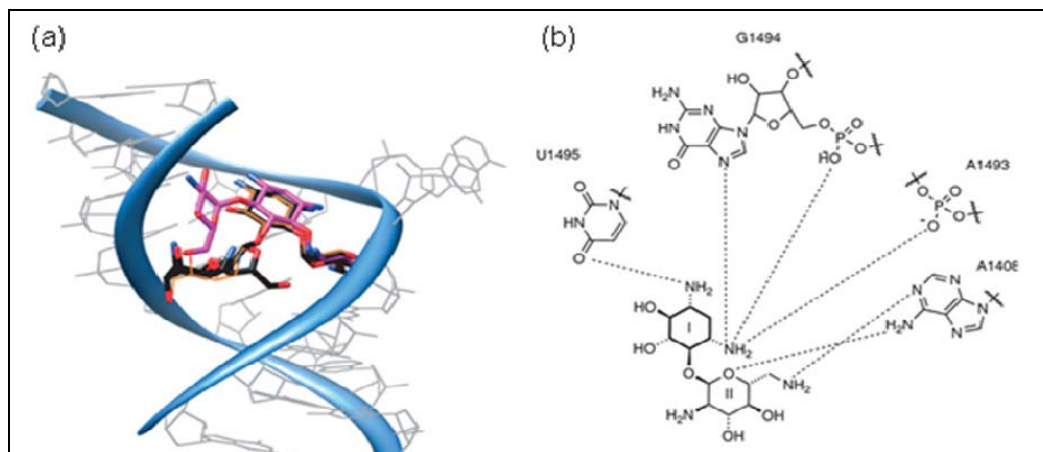
Figura 1.31. Modo de acción de los antibióticos aminoglicósidos en el ribosoma



1.2.3.2. Estructura de los aminoglicósidos en complejo con su diana biológica.

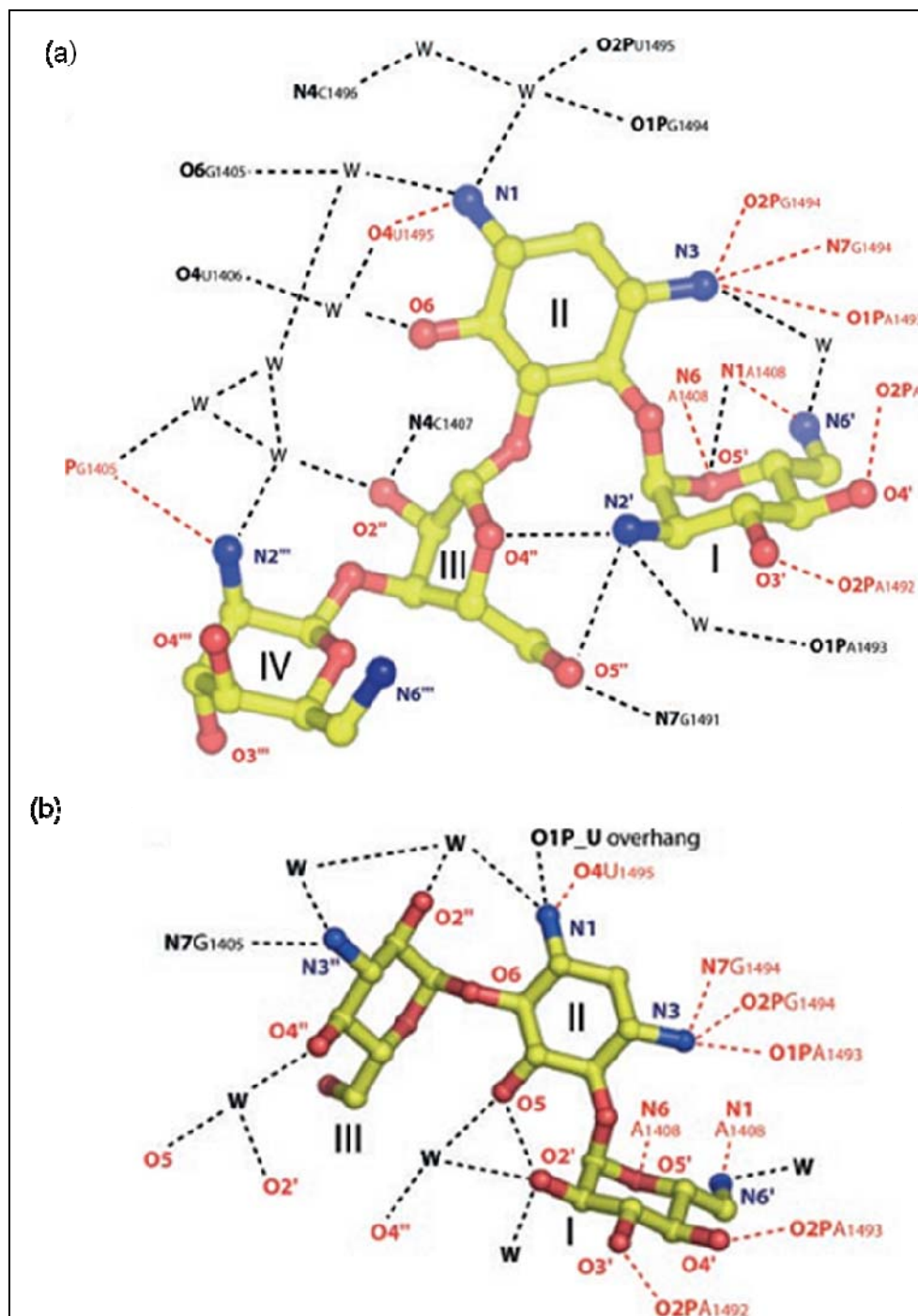
En lo que respecta a la estructura del aminoglicósido en complejo con su diana biológica hay que tener en cuenta que a pesar de las diferencias estructurales, las distintas familias de aminoglicósidos conservan rasgos comunes en su interacción con el ARN (Vicens y Westhof, 2001; Vicens y Westhof, 2002; Vicens y Westhof, 2003a).^{65a, 70} Así, tanto en aminoglicósidos que poseen una unidad de 2-DOS sustituida en las posiciones 4,5- (paromomicina, neomicina, ribostamicina, etc.), como en aquellos en los que las sustituciones afectan a las posiciones 4, 6- (kanamicina, tobramicina, gentamicina, etc.), los anillos I y II adoptan una posición similar en el surco mayor (figura 1.32a), dando lugar a interacciones prácticamente idénticas con el ARN (figura 1.32b).

Figura 1.32. (a) Superposición de las estructuras cristalográficas de neomicina B (pdb:2ET4), tobramicina (pdb:1L4C) y paromomicina (pdb:1J7T) en el Sitio A. (b) Interacciones entre los anillos I y II de los aminoglicósidos con el ARN



A partir de estos datos cabe destacar que, si bien diversos estudios han establecido que los anillos I y II constituyen el fragmento mínimo de antibiótico necesario para obtener una unión específica al sitio A,⁵⁹ la estabilidad de los complejos, así como la especificidad de la interacción, se ve incrementada, en gran medida por la presencia de los anillos III y IV, en el caso de los derivados 4,5-disustituídos y del anillo III, en el caso de los 4,6-disustituídos. Más concretamente los anillos III y IV de los derivados de tipo 4,5 presentan diversos contactos (fundamentalmente enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo electrostático) con el tallo inferior del “sitio A” (figura 1.33a). En el caso del anillo III de los derivados de tipo 4,6, éste se prolonga hacia el tallo superior del sitio A, dando lugar a interacciones específicas con varios residuos de ARN (figura 1.33b).

Figura 1.33. (a) Interacciones de un antibiótico de tipo 4,5 (paromomicina) en complejo con el ARN. (b) Interacciones de un antibiótico de tipo 4,6 (kanamicina A) con la misma diana biológica.



1.2.4.- Mecanismos de resistencia a antibióticos aminoglicósidos

Quizás el avance médico más importante del siglo XX, y uno de los mayores de todos los tiempos, haya sido el descubrimiento, en 1929, de que determinadas sustancias producidas por hongos podían matar a las bacterias causantes de diversas enfermedades humanas. Hoy, 80 años después, el desarrollo de nuevos antibióticos vuelve a ser una de las prioridades en investigación biomédica. La emergencia y diseminación de resistencia a antibióticos en organismos patógenos, constituyen, sin lugar a dudas, un serio problema de salud y requiere la identificación y desarrollo urgente de nuevos fármacos. Así, existen en la actualidad ejemplos de cepas bacterianas resistentes para prácticamente todos los antibióticos disponibles en el mercado, incluyendo el caso de bacterias responsables de graves enfermedades como son el *E. faecalis*, *M.tuberculosis* y *P. aeruginosa*.

Los aminoglicósidos fueron de los primeros grupos de antibióticos a los que se desarrolló resistencia.⁷¹ De un modo general ésta puede tener tres orígenes diferentes que pueden deberse a varias causas (figura 1.31):^{43, 72}

1.2.4.1. Disminución de la concentración intracelular de aminoglicósido.

1.2.4.1.1. Reducción del paso de compuesto al interior.

1.2.4.1.2. Activación de un transportador.

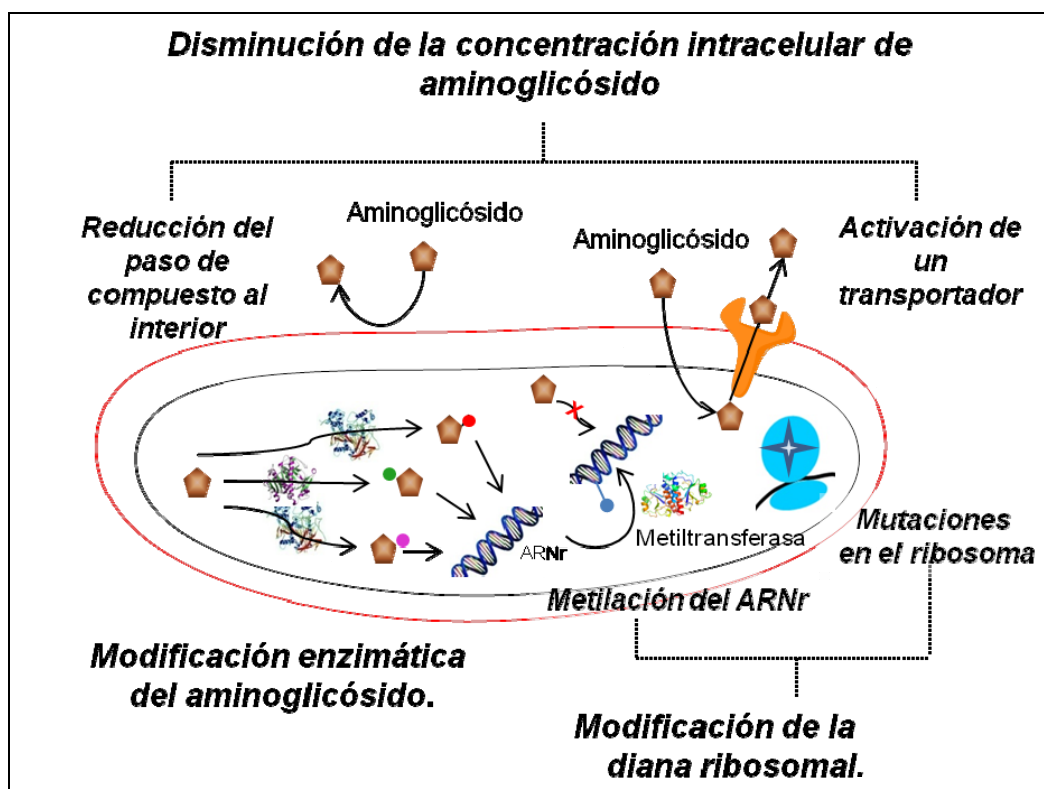
1.2.4.2. Modificación de la diana ribosomal.

1.2.4.2.1. Metilación del ARNr.

1.2.4.2.2. Mutaciones en el ribosoma.

1.2.4.3. Modificación enzimática del aminoglicósido.

Figura 1.31.- Mecanismos que confieren resistencia a antibióticos aminoglicósidos.



1.2.4.1. Disminución de la concentración intracelular de aminoglicósido

La concentración de aminoglicósido puede disminuir en el interior celular debido a la reducción del paso de compuesto al interior, a la activación de un transportador que lo elimine, o a la acción de ambos.⁷³

1.2.4.1.1. Reducción del paso de compuesto al interior. Cambios en los componentes de membrana involucrados en la unión electrostática inicial del aminoglicósido, se han asociado al aumento en los niveles de resistencia, especialmente en el caso de *P. aeruginosa*.⁷⁴ El alginato extracelular producido por las cepas mucoides de *P. aeruginosa*, causa la disminución de la entrada y del efecto bactericida inicial del antibiótico, por lo que se ha propuesto que este alginato polianiónico viscoso podría funcionar como una barrera física al compuesto.⁷³

1.2.4.1.2. Activación de un transportador. El transportador bacteriano que elimina el antibiótico es dependiente de energía y es una de las mayores causas de resistencia. Esto se manifiesta, sobre todo, en los patógenos oportunistas y multirresistentes que ocasionan infecciones nosocomiales, y que han de desarrollarse en

un medio en el que existe una presencia constante de antibiótico. Las especies bacterianas que expresan constitutivamente estos transportadores son intrínsecamente resistentes a niveles bajos de diferentes antibióticos.⁷⁵ Se pensaba que estos transportadores eran específicos de compuestos hidrofóbicos o anfipáticos, y que los aminoglicósidos no estarían afectados por este mecanismo de resistencia. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que los aminoglicósidos son sustratos de varios transportadores, incluyendo miembros de las cinco superfamilias de transportadores bacterianos.⁷⁶

1.2.4.2. Modificación de la diana ribosomal

Se distinguen principalmente dos vías de modificación de la diana ribosomal, la metilación del ARNr 16S y mutaciones en el ribosoma.

1.2.4.2.1. Metilación del ARNr. Muchos microorganismos productores de aminoglicósidos expresan ARNr-metilasas, enzimas capaces de modificar el ARNr 16S en posiciones fundamentales para la unión del antibiótico, con el fin de sobrevivir a la acción de los compuestos que ellas mismas originan.⁷⁷ Las correspondientes ARNr-metiltransferasas constituyen la familia de las enzimas que confieren resistencia a antibióticos aminoglicósidos habiendo sido caracterizadas algunas de ellas hasta la fecha. A modo de ejemplo, la ARNr-metiltransferasa KamA de *S. tenjimariensis* y la KamB de *S. tenebrarius* catalizan la modificación de la adenina en posición 1408, lo que confiere resistencia a antibióticos como la kanamicina, tobramicina, sisomicina y apramicina.⁷⁷⁻⁷⁸ La ARNr-metiltransferasa GmrA, del productor de gentamicina *M. purpurea*, y la Kgmb de *S. tenebrarius*, catalizan la modificación de la guanina 1405, confiriendo resistencia a los derivados 4,6-disustituídos.^{77, 79} Presumiblemente, la metilación de estos nucleótidos inhibe los contactos intermoleculares que realizan con el antibiótico.

Hasta hace unos años, se pensaba que los genes que codifican para las metiltransferasas del ARNr 16S eran exclusivos de los microorganismos productores de aminoglicósidos. Sin embargo, tres trabajos de los años 2003 y 2004 describen la caracterización de genes similares en muestras clínicas aisladas de patógenos humanos Gram(-),^{79d, 80} lo que supone un grave problema a tener en cuenta, sobre todo considerando que estos genes pueden ser diseminados fácilmente.

1.2.4.2.2. Mutaciones en el ribosoma. La resistencia a antibióticos aminoglicósidos debida a la mutación de la diana ribosomal es sólo relevante en clínica en el caso de *M. tuberculosis*, el único género de eubacterias con especies que poseen una única copia del operón ribosomal. Esto implica que una sola mutación puede dar lugar a la producción de una población homogénea de ribosomas mutados, y por lo tanto desarrollar resistencia.⁸¹

Las mutaciones en genes que codifican para proteínas ribosomales pueden también alterar la actividad de los aminoglicósidos. Destacan las mutaciones en la proteína S12, que confiere resistencia a la estreptomicina en *M. tuberculosis* y en otras especies.⁸²

1.2.4.3. Modificación enzimática del aminoglicósido.

Se trata del mecanismo más relevante ⁸³ ya que es el más comúnmente encontrado en muestras clínicas de bacterias Gram-(-) y Gram-(+).^{72a} Este mecanismo implica la participación de enzimas capaces de modificar selectivamente grupos polares clave del antibiótico. En general, esta modificación se traduce en una drástica disminución de su afinidad por el sitio A del ribosoma, y por lo tanto no se llega a desencadenar la Fase II del modo de acción (ver figura 1.26), permitiendo a la bacteria sobrevivir en presencia del antibiótico.⁸⁴

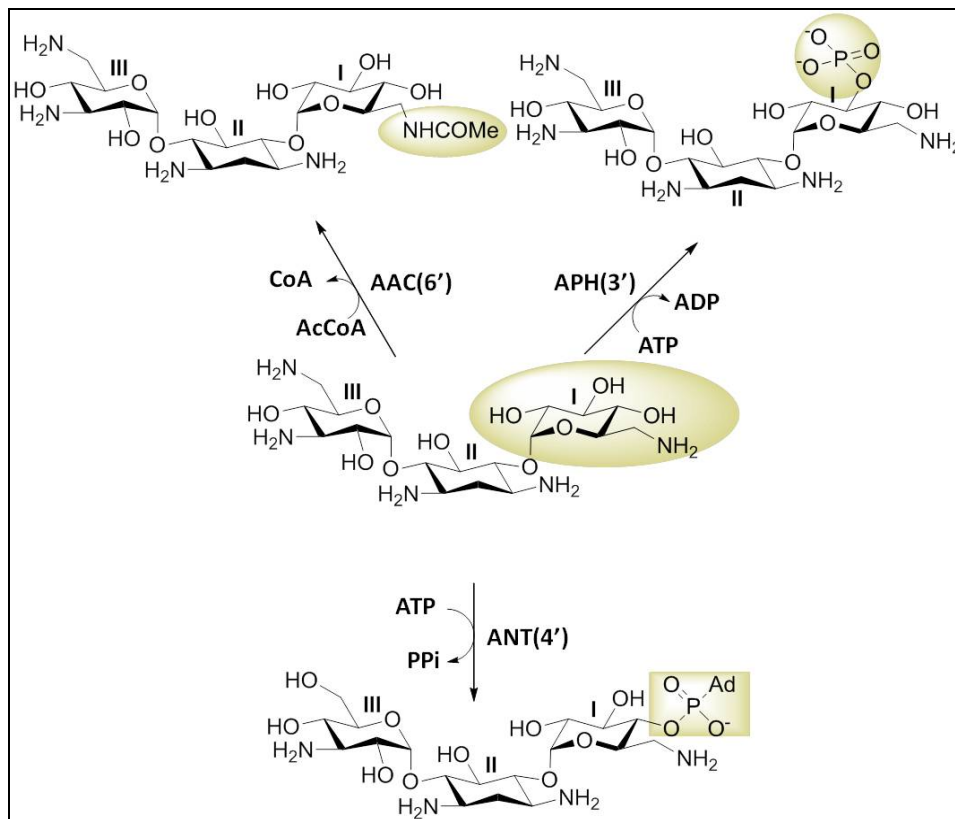
La inactivación enzimática de los aminoglicósidos puede tener lugar debido a la transferencia de un grupo acetilo, de un grupo adenilo o de un grupo fosfato. De acuerdo con esto, los enzimas implicados en la resistencia bacteriana pueden, de un modo general, clasificarse en tres grandes grupos (esquema 1.1):

1.2.4.3.1. Aminoglicósido N-acetiltransferasas (AACs): Son enzimas que catalizan la N-acetilación de un grupo amino presente en el antibiótico, utilizando acetil-CoA como donador del grupo acilo. En algunos casos, estos enzimas son capaces de acetilar un grupo hidroxilo del aminoglicósido.

1.2.4.3.2. Aminoglicósido O-fosfotransferasas (APHs): Catalizan la transferencia del grupo γ -fosfato del ATP a uno de los grupos hidroxilo presentes en el aminoglicósido.

1.2.4.3.3. Aminoglicósido *O*-adeniltransferasas (ANTs): Catalizan la reacción de adenilación de un grupo hidroxilo, utilizando ATP como donador de adenilo.

Esquema 1.1. Tipos de inactivación enzimática de un antibiótico aminoglicósido

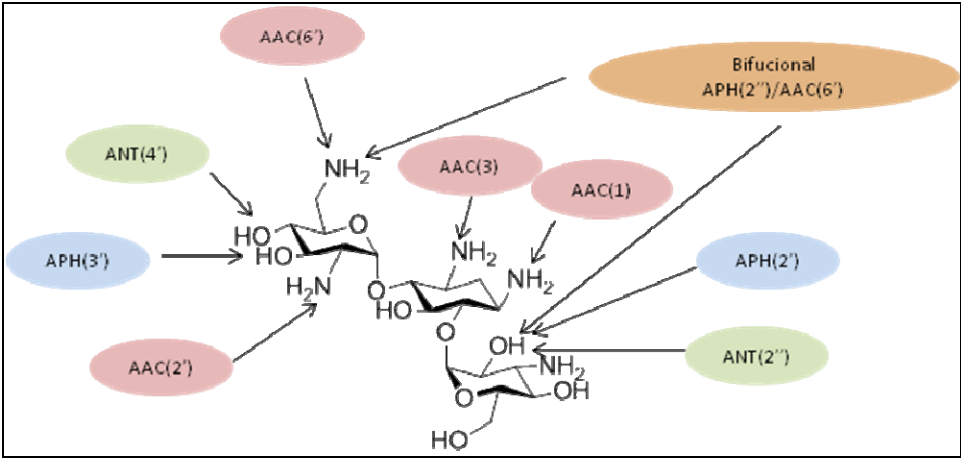


Así mismo, se ha detectado en los últimos años la aparición de enzimas bifuncionales que combinan dos actividades, ampliando el espectro de resistencia.

La reacción que catalizan estas enzimas es normalmente regioselectiva, y el nivel de resistencia que confiere cada una de ellas difiere significativamente entre microorganismos y cepas, y depende de varios factores, como la cantidad de enzima producido, su eficacia catalítica y el tipo de aminoglicósido.

Cada una de estas familias se divide en clases según el sitio de modificación, el cual viene indicado entre paréntesis (figura 1.32).

Figura 1.32. Posibles modificaciones covalentes de la Kanamicina B por enzimas modificadoras de estos antibióticos.



Además se subdividen en tipos, designado por números romanos, que especifican el patrón de resistencia que confieren (tabla 1.1).

Tabla 1.1 Enzimas Modificadoras de Aminoglicosidos y sus perfiles de resistencia

Enzima	Sustratos	
	Aminoglicósido ^a	Donador
<i>N</i>-Acetiltransferasas (AACs)		
AAC(6')- I	T, A, N, D, S, K, I	AcCoA
AAC(6')- II	T, G, N, D, S, K	AcCoA
AAC(3)- I	G, S, F	AcCoA
AAC(3)- II	T, G, N, D, S	AcCoA
AAC(3)- III	T, G, D, S, K, N, P, L	AcCoA
AAC(3)- IV	T, S, N, D, A	AcCoA
AAC(3)- VII	G	AcCoA
AAC(1)	P, L, R, AP	AcCoA
AAC(2')-I	T, S, N, D, Ne	AcCoA
<i>O</i>-Nucleotidiltransferasas (ANTs)		
ANT(2'')-I	T, G, D, S, K	ATP
ANT(3')-I	St, Sp	ATP
ANT(4')-I	T, A, D, K, I	ATP
ANT(4')-II	T, A, D, K, I	ATP
ANT(6')-I	St	ATP
ANT(9')-I	Sp	ATP

<i>O-Fosfotransferasas (APHs)</i>		
APH(3')-I	K, Ne, L, P, R	ATP
APH(3')-II	K, N, B, P, R	ATP
APH(3')-III	K, N, L, P, R, B, A, I	ATP
APH(3')-IV	K, N, B, P, R	ATP
APH(3')-V	N, P, R	ATP
APH(3')-VI	K, N, P, R, B, A, I	ATP
APH(3')-VII	K, N	ATP
APH(2'')-I	K, G, T, S, D	ATP
APH(2'')-II	K, G, T, N, D	ATP
APH(2'')-III	K, G, T	ATP
APH(3'')-I	St	ATP
APH(7'')-I	H	ATP
APH(4)-I	H	ATP
APH(6)-I	St	ATP
APH(9)-I	Sp	ATP

^aA: amikacina, Ap: apramicina, B: butirosina, D: dibekacina, G: gentamicina, H: higromicina, I: isepamicina, K: kanamicina A, L: lividomicina, N: netilmicina, Ne: neomicina B, P: paromomicina, R: ribostamicina, S: sisomicina, Sp: espectinomicina, St: estreptomicina, T: tobramicina.

Finalmente, en la tabla 1.2 se presentan los valores de concentración mínima inhibitoria de los antibióticos naturales Kanamicina A y B en diferentes cepas, observándose una pérdida total de la actividad antibiótica en presencia de las enzimas de resistencia.

Tabla 1.2.- Concentración Inhibitoria Mínima de los antibióticos naturales Kanamicina A y B en presencia de cepas resistentes y no la modificación enzimática.

<i>Cepas bacterinas</i>	<i>Kanamicina A</i>	<i>Kanamicina B</i>
<i>S.aereus</i>	1	0.5
<i>S.aereus</i> (APH(3')-IV)	>125	125
<i>E.coli</i>	4	2
<i>E.coli</i> (APH(3')-I)	>125	125

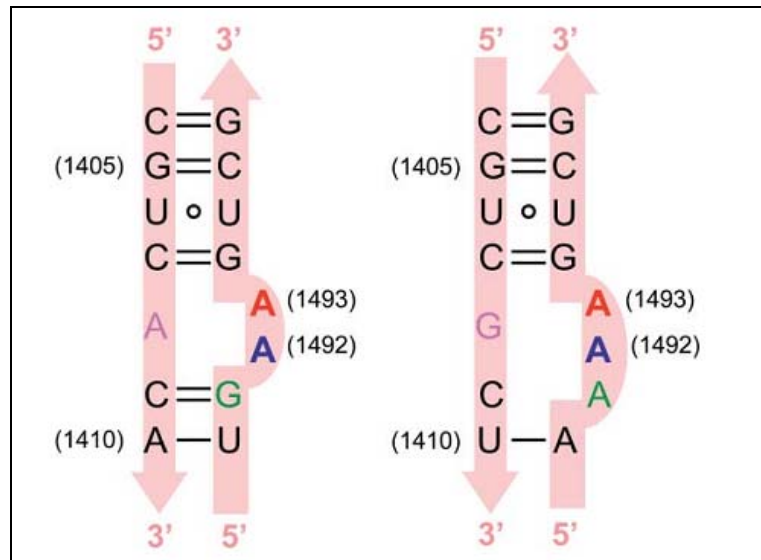
<i>E. coli</i> (ANT(2''))	125	32
<i>E. coli</i> (AAC(6'))	>125	32
<i>P.aeruginosa</i>	63	63
<i>P.aeruginosa</i> (APH(3') + AAC (3)-I)	32	32
<i>P.aeruginosa</i> (APH (3')-IV)	>125	125
<i>P.aeruginosa</i> (APH (3')-I + AAC (6'))	>125	125
<i>P.aeruginosa</i> (perm. mutant)	>125	125

1.2.5. Reacciones adversas: Toxicidad

Una de las mayores limitaciones de usar aminoglicósidos como drogas es su elevada toxicidad para las células eucariotas, tanto a nivel del riñón (nefrotoxicidad) como a problemas asociados al oído (ototoxicidad). El origen de su toxicidad todavía no está muy claro pero probablemente resulta de una combinación de diferentes mecanismos tales como interacciones con los fosfolípidos, inhibición de fosfolipasas y formación de radicales libres.⁸⁵

Aunque estos antibióticos han sido considerados bastante selectivos a su diana biológica, la mayoría de los aminoglicósido pueden también unirse al sitio A eucariótico pero con afinidades mucho más bajas que al sitio A bacteriano. En la figura 1.33 se muestra la estructura secundaria de ambos ribosomas y se observa que son muy parecidos, diferenciándose solo en dos bases.

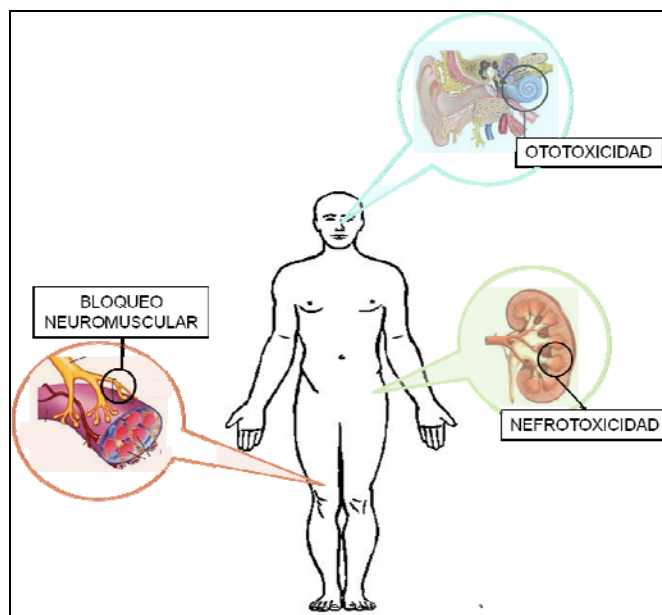
Figura 1.33. Estructura secundaria del sitio A ARN ribosomal procariótico 16S y eucariótico 18S, observándose solo un cambio relevante en las dos bases que están resaltadas en rosa (A-G) y verde (G-A). Las adeninas conservadas A1492 y A1493 están en azul y rojo respectivamente.



La inhibición de translación en células eucariotas es también una de las posibles causas de la toxicidad que presentan estas moléculas. Otro factor adicional a la citotoxicidad podría ser la unión al Sitio A ARN 12S mitocondrial, cuya secuencia es muy parecida a la del sitio A bacteriano.

Entre las principales reacciones adversas podemos indicar tres, tal como se indica en la figura 1.34:

Figura 1.34. Efectos adversos de los aminoglicósidos.



1.2.5.1 Toxicidad acústica (ototoxicidad). Los aminoglicósidos alcanzan concentraciones muy altas en la perilinfa, donde la semivida se prolonga hasta 10-12 horas, tiempo muy superior a las 2-3 horas de la semivida plasmática. Aunque no puede relacionarse totalmente la concentración plasmática de aminoglicósidos con la toxicidad se ha pretendido diferenciar la ototoxicidad de los aminoglicósidos, pero no está perfectamente demostrado que compuesto produce más daño a nivel auditivo y/o a nivel vestibular. Pero el riesgo de ototoxicidad es mayor en tratamientos prolongados.

El primer efecto toxico en el oído ocurre en las células del órgano de Corti y no en el VIII par craneal, que se altera más tarde. Este mecanismo por el cual se produce no se conoce con exactitud, pero presumiblemente se produce la unión de los aminoglicósidos al fosfatidilinositol, en los mismos puntos de unión que el calcio. Al ser el complejo aminoglicósido-fosfoinositol un sustrato pobre para las enzimas desfosforilantes su papel en la fisiología de la membrana se altera. Además es posible que una alteración prolongada en la permeabilidad de la membrana conduzca alteraciones bioquímicas secundarias en la célula y así la destrucción en el órgano de Corti.

1.2.5.2. Efectos neurotóxicos (nefrotoxicidad). Aunque la lesión más importante se produce en las células del túbulo proximal, se ha demostrado también alteraciones en el glomérulo, consistentes en una reducción del filtrado glomerular secundario a un

descenso del coeficiente de ultrafiltración y el flujo sanguíneo renal. También se ha observado que existe una reducción en el número y el tamaño de los poros de la superficie del endotelio glomerular, en los túbulos se observa necrosis celular que no llega a afectar a la membrana basal.

El antibiótico, como comentamos anteriormente, se une inicialmente al fosfatidilinositol de la membrana celular, posteriormente en el interior de la célula al que llega por pinocitosis un proceso que requiere energía y que es regulado por la concentración de calcio intracelular, se concentra en los lisosomas donde se originan unas estructuras denominadas cuerpos mieloides o citosegregasomas. A nivel bioquímico los aminoglicosidos inhiben las fosfolipasas A₁, A₂ y C₁ y reducen la actividad de la esfingomielasa. Una vez superada la capacidad acumulativa de los lisosomas, estos se rompen y el aminoglicosido liberado en el citoplasma de la célula donde interactúa con diferentes estructuras, produciendo finalmente la muerte celular.

1.2.5.3. Bloqueo neuromuscular. Ocurre cuando se alcanzan concentraciones muy altas de aminoglicósidos en la placa motriz. El mecanismo de bloqueo consiste en la inhibición de la liberación de acetilcolina a nivel pre-simpático como en el bloqueo de receptores colinérgicos *post*-simpáticos, a este nivel parece que los aminoglicosidos compiten con el Ca²⁺ por sus sitios de unión evitando su participación en la liberación de acetilcolina, explicando el hecho de que el bloqueo sea antagonizable por Ca²⁺ y también aunque en menor grado por neostigmina.

En la última década se han realizado diferentes estudios para solucionar el problema de la toxicidad⁸⁶ como el uso de antioxidantes para reducir los niveles de radicales libres⁸⁷ y el uso de poli-L-aspartato y daptomicina para reducir la interacción del antibiótico con los fosfolípidos. La megalina, receptor multiligando, se ha visto que interviene en el proceso de absorción.⁸⁸ Teniendo esto en cuenta, otro estudio que se ha llevado a cabo ha sido la administración de antagonistas que compiten por la unión del aminoglicósido a la megalina, resultando en una disminución en la absorción y toxicidad.⁸⁹ También se ha estudiado la cantidad y forma en la que se administra el antibiótico para ver así su influencia en la toxicidad.⁹⁰

**1.2.6.-Estrategias para recuperar el uso de los aminoglicósidos:
Modificaciones sintéticas para la obtención de nuevos antibióticos**

Los aminoglicósidos están constituidos por aminoazúcares unidos a aminociclitolos mediante enlaces glicosídicos con sustituciones de tipo hidroxilo y amino, pudiendo considerarse desde un punto de vista químico moléculas complejas.

El interés científico por la síntesis de nuevos aminoglicósidos comenzó en los años 1970,⁹¹ con la publicación, casi simultánea, de varios trabajos sobre la preparación de algunos análogos estructurales de los antibióticos naturales. En aquel momento, la modificación química de este tipo de derivados era un ejercicio puramente académico, describiéndose incluso la síntesis total de algunos de estos antibióticos, como por ejemplo, la kanamicina A.⁹²

Sin embargo, los avances en el estudio de los mecanismos de resistencia⁴³ y la información estructural sobre la unión de estos antibióticos a su diana biológica, el sitio A de la subunidad menor del ribosoma,^{59, 64b, 70b, 93} han impulsado en los últimos años el desarrollo de diversas estrategias sintéticas para la obtención de nuevos aminoglicósidos.⁹⁴

A modo de introducción en este apartado se recogen las metodologías generales empleadas para la preparación de aminoglicósidos sintéticos, algunos de los ejemplos más representativos de los derivados preparados durante los últimos años así como las perspectivas futuras en este campo.

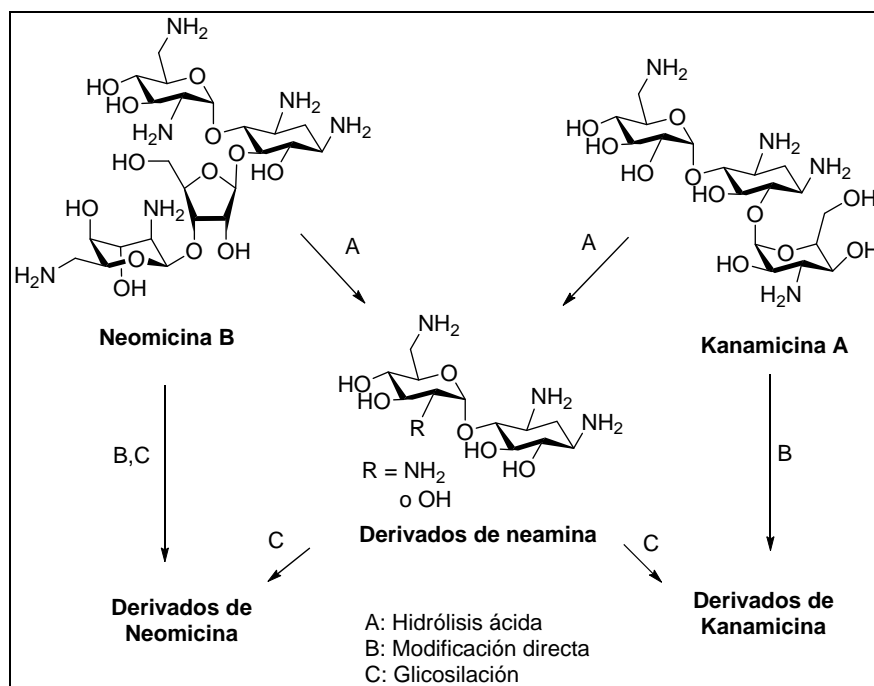
1.2.6.1. Metodologías generales para la preparación de nuevos antibióticos.

En general en la bibliografía científica pueden encontrarse dos tipos de aproximaciones para la síntesis de estos compuestos (esquema 1.2):

1.2.6.1.1. Modificación puntual de antibióticos aminoglicósidos naturales (modificación B, esquema 1.2).

1.2.6.1.2. Sustitución de los aminoazúcares naturales por azúcares estructuralmente modificados (modificaciones A y C, esquema 1.2).

Esquema 1.2. Estrategias generales para la síntesis de nuevos antibióticos aminoglicósidos.



Uno de los factores a tener en cuenta para emprender la preparación de nuevos derivados de aminoglicósidos es la disponibilidad de los sustratos de partida.

En general, aunque han sido diversos los antibióticos empleados para este fin, la neomicina B y la kanamicina A son dos de los más adecuados ya que están disponibles comercialmente a gran escala y a precios asequibles. Aunque la neomicina B y la kanamicina A comerciales se encuentran en ocasiones mezcladas con proporciones variables (10-20%) de neomicina A y C y de kanamicina B, respectivamente, estos componentes minoritarios no dificultan la síntesis y caracterización de los compuestos preparados.

1.2.6.1. Modificación puntual de antibióticos aminoglicósidos naturales.

La introducción de variaciones puntuales en los aminoglicósidos a través de su modificación química resulta en la mayoría de los casos un gran reto debido a que poseen muchos grupos funcionales de tipo amino e hidroxilo cuya modificación regioselectiva en ambos casos no resulta sencilla, siendo uno de los pasos clave en el éxito de la síntesis la elección acertada de los grupos protectores a utilizar.

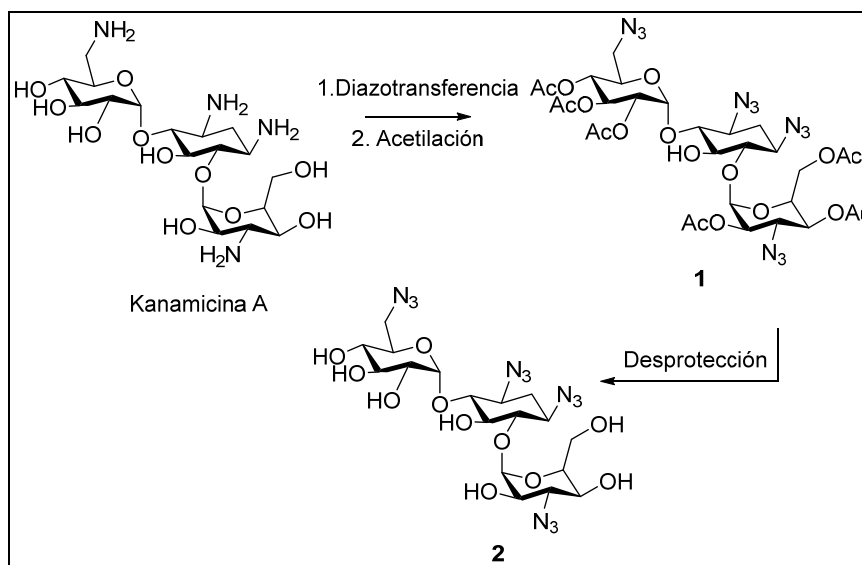
En lo que respecta a los grupos amino dos han sido las aproximaciones más empleadas para su protección/enmascaración. La primera utiliza diferentes carbamatos como $\text{MeO}_2\text{C}-$, $\text{EtO}_2\text{C}-(\text{Cbe})$, $\text{PhO}_2\text{C}-$, $\text{BnO}_2\text{C}-(\text{Cbz})$ y $t\text{-BuO}_2\text{C}-$ (Boc). Se trata de grupos protectores fáciles de introducir y de eliminar con un precio bastante asequible y que, además, pueden emplearse en protecciones regioselectivas.⁹⁵

Sin embargo, la utilización de los mismos lleva asociado problemas de solubilidad, purificación y caracterización de los intermedios sintéticos de tipo poli-carbamato.

La segunda aproximación, el uso de azidas para enmascarar al grupo amino, en el caso de los aminoglicósidos⁹⁶ además de tener ventajas tales como rendimientos óptimos, retención de configuración de los centros estereogénicos, condiciones suaves de reacción y compatibilidad con muchos grupos funcionales, soluciona los problemas de solubilidad, purificación y caracterización que presentan los carbamatos.

La metodología más común para la obtención de azidas a partir de aminas es su tratamiento con un reactivo de diazotransferencia,⁹⁷ generalmente la azida triflúor (TfN₃), en presencia de una sal de un metal de transición como catalizador, siendo posible la utilización de varios disolventes tales como CH_2Cl_2 ⁹⁸, CH_3CN ⁹⁹ o una mezcla de tolueno y H_2O .¹⁰⁰ Como inconveniente cabe destacar que en ocasiones resulta difícil la purificación del compuesto tras la reacción de diazotransferencia. Sin embargo, y tal como se muestra en el esquema 1.3, esto puede solucionarse mediante la acetilación “*in situ*” de la mezcla, purificación del derivado acetilado **1** y posterior eliminación de los acetilos mediante un simple tratamiento en medio básico, obteniendo el derivado **2** puro.

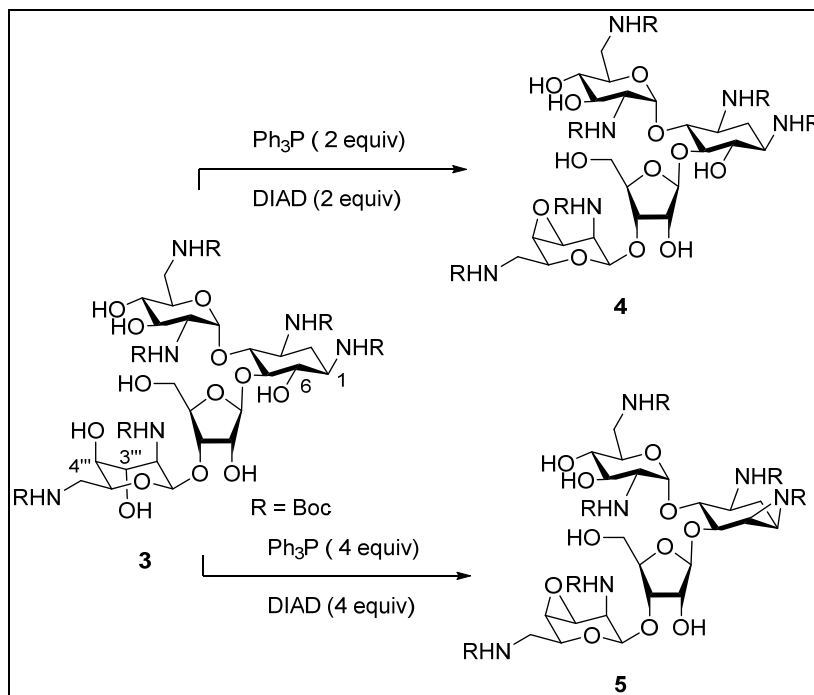
Esquema 1.3. Metodología general para la enmascaración de grupos amino como azidas en aminoglicósidos.



En lo que respecta a los grupos hidroxilo es necesario considerar que los aminoglicósidos son compuestos polihidroxilados, lo que hace necesario, al igual en el caso de los oligosacáridos, un gran número de etapas de protección y desprotección para diferenciar los diferentes alcoholes presentes en la molécula. Por esto motivo, su modificación puntual resulta todavía en la actualidad una tarea difícil que no puede hacerse de manera rutinaria y automatizada.¹⁰¹

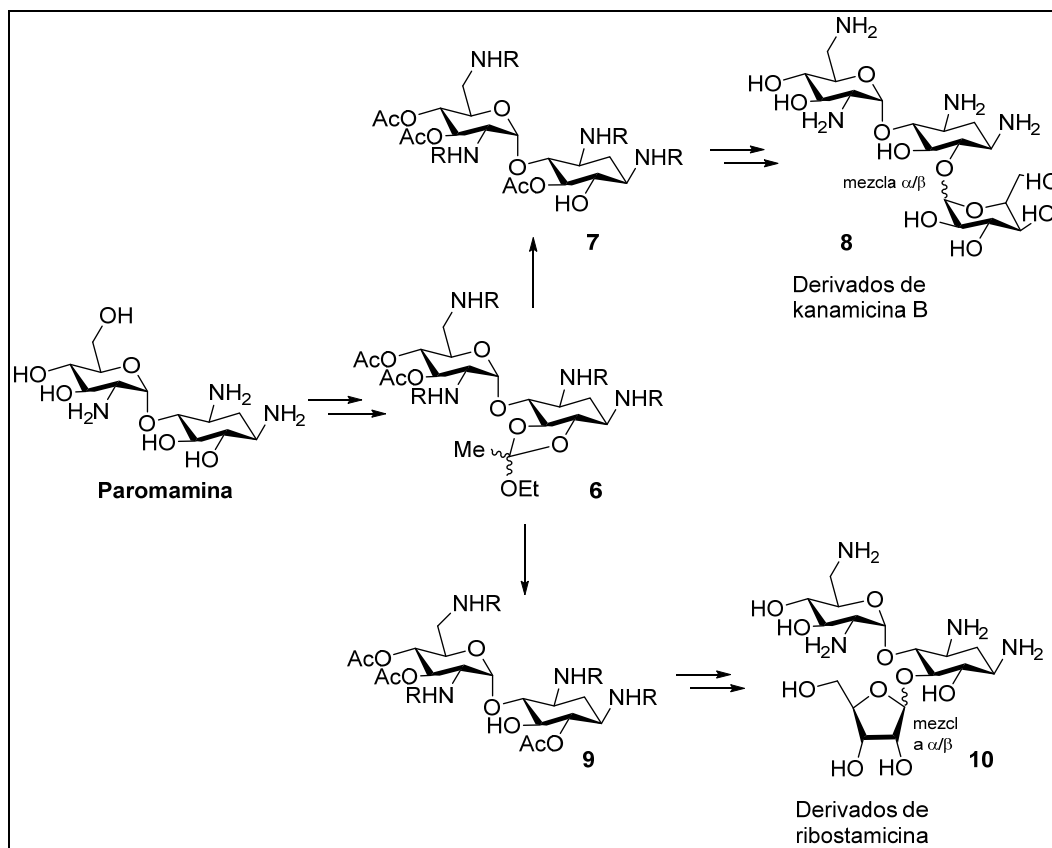
En este contexto, durante los últimos años se han desarrollado metodologías sintéticas para la modificación puntual de algunos hidroxilos de forma regioselectiva, sin necesidad de emplear grupos protectores. A modo de ejemplo (esquema 3.5), el tratamiento en condiciones de Mitsunobu del derivado de neomicina B **3** permitió la diferenciación de las posiciones 3''' y 4''' mediante la formación de un epóxido (**4**). Además fue posible la selección adicional de las posiciones 1 y 6, obteniendo una aziridina (**5**) entre ambas si se forzaban las condiciones de reacción.¹⁰²

Esquema 1.5. Modificación regioselectiva de la neomicina B en condiciones de Mitsunobu.



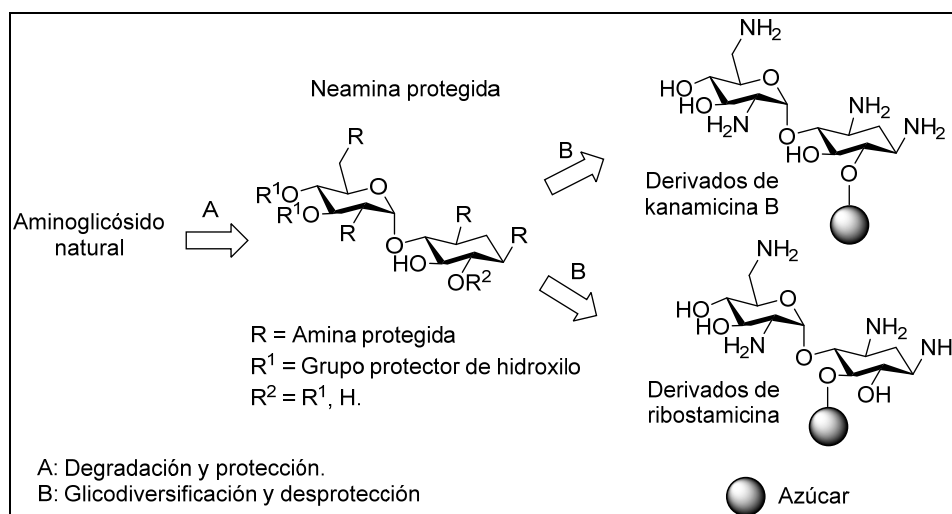
1.2.6.2. Obtención de aminoglicósidos mediante glicodiversificación.

El interés científico por la utilización de esta aproximación sintética comenzó en la década de los setenta, con la publicación, casi simultánea, de tres trabajos pioneros sobre la síntesis de aminoglicósidos a través de reacciones de glicosilación de derivados de neamina (**6**), obtenidos a partir de la paromamina, con diversos dadores de glicosilo (esquema 1.6), obteniendo aminoglicósidos 4,6-disustituídos (**8**) y 4,5-disustituídos (**10**).^{103 104}

Esquema 1.6. Primera obtención de aminoglicósidos mediante glicosilación.

Aunque en aquel momento la aplicación de esta estrategia era un ejercicio puramente académico, sin embargo, supuso el punto de partida en el desarrollo de una metodología general, denominada glicodiversificación, que ha permitido la preparación de un gran número de librerías de aminoglicósidos tanto de tipo kanamicina (4,6-disustituídos) como de tipo neomicina (4,5-disustituídos) (esquema 1.7).

Esquema 1.7. Glicodiversificación de aminoglicósidos.



Tal como se muestra en el esquema 1.7 la metodología consta de dos fases fundamentales: (a) obtención del pseudo-disacárido constituido por los anillos I y II de los antibióticos naturales (neamina) convenientemente protegida y (b) incorporación de nuevos azúcares con modificaciones estructurales a través de reacciones de glicosilación.

1.2.6.2. Antibióticos aminoglicósidos sintéticos.

Entre los diferentes tipos de aminoglicósidos sintéticos obtenidos hasta la fecha se pueden distinguir dos grupos fundamentales, dependiendo de cuál es el objetivo buscado: Mejorar la afinidad de unión al ARN (apartado 1.2.6.2.1) o vencer la resistencia (apartado 1.2.6.2.2.).

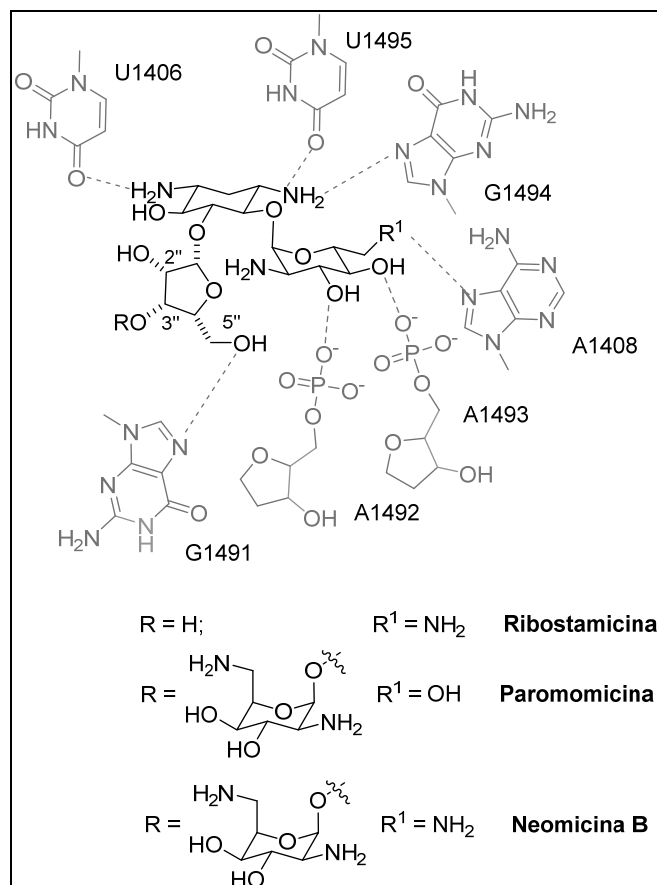
1.2.6.2.1. Derivados de aminoglicósidos para mejorar la afinidad de unión al ARN.

Recientemente, se ha determinado la estructura del sitio A, diana de estos antibióticos en complejo con la práctica totalidad de los aminoglicósidos. Estos trabajos han abierto la puerta al diseño racional de nuevos ligandos con mayor afinidad por el ARN.

Así a partir de las estructuras cristalográficas del ARN con los antibióticos 4,5-disustituidos (cuya conformación bioactiva se muestra en la figura 1.35) se han diseñado tres nuevas familias de compuestos. La estrategia utilizada ha sido la

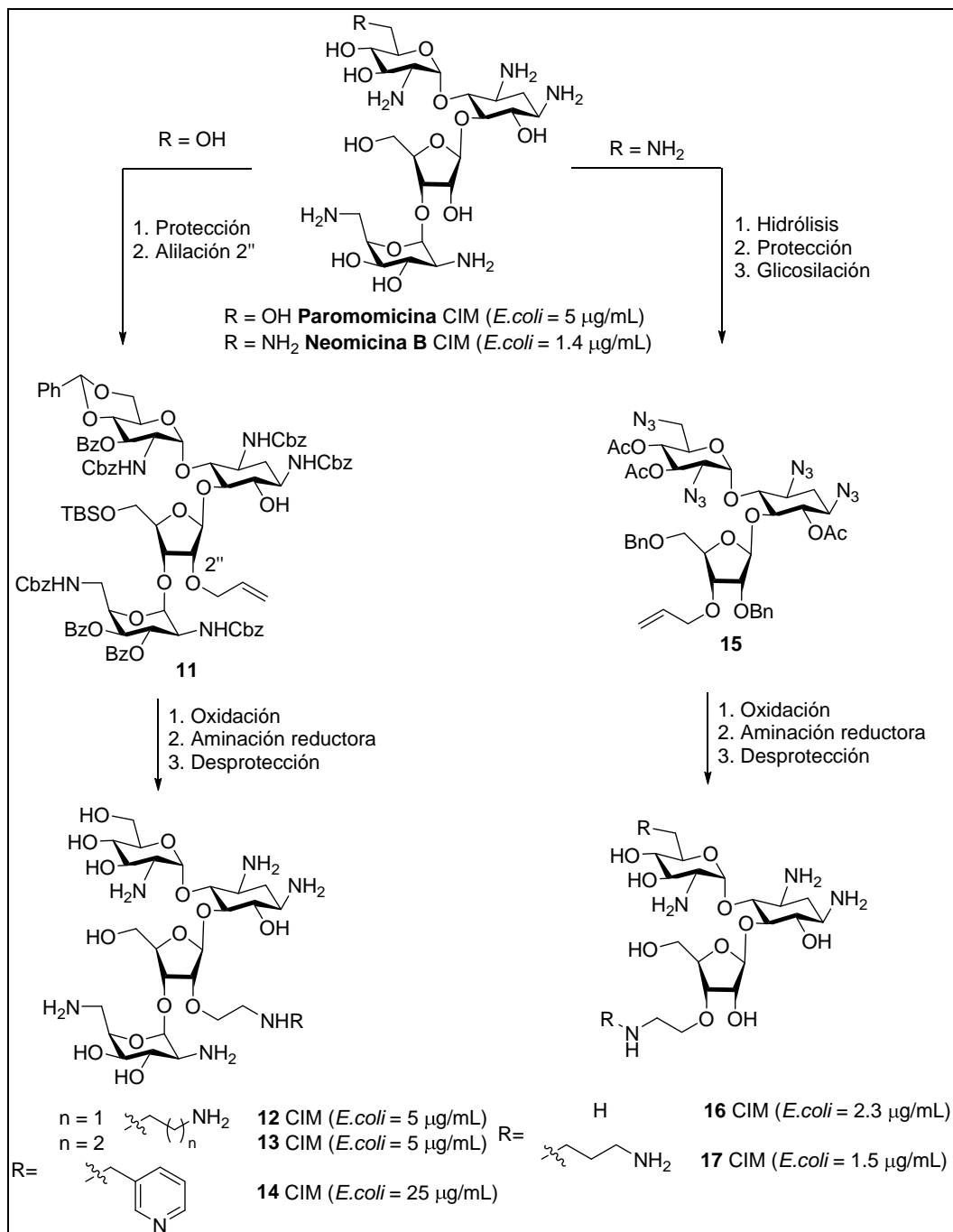
introducción de cadenas amino-alquílicas (consideradas miméticos sencillos de amino-azúcares) o unidades de amino-azúcar, en posiciones determinadas, con objeto de incrementar el número de contactos en el complejo del ARNr con el aminoglicósido, mejorando teóricamente su afinidad.

Figura 1.35. Conformación bioactiva de la paromomicina y principales interacciones con el ARNr



En el caso de la paromomicina y la ribostamicina se introdujeron cadenas amino-alquílicas en posiciones 2''¹⁰⁵ y 3''^{98a} respectivamente. En ambos casos la introducción de las cadenas se llevó a cabo siguiendo una secuencia sintética similar: (a) oxidación de un doble enlace y (b) aminación reductora (esquema 1.8).

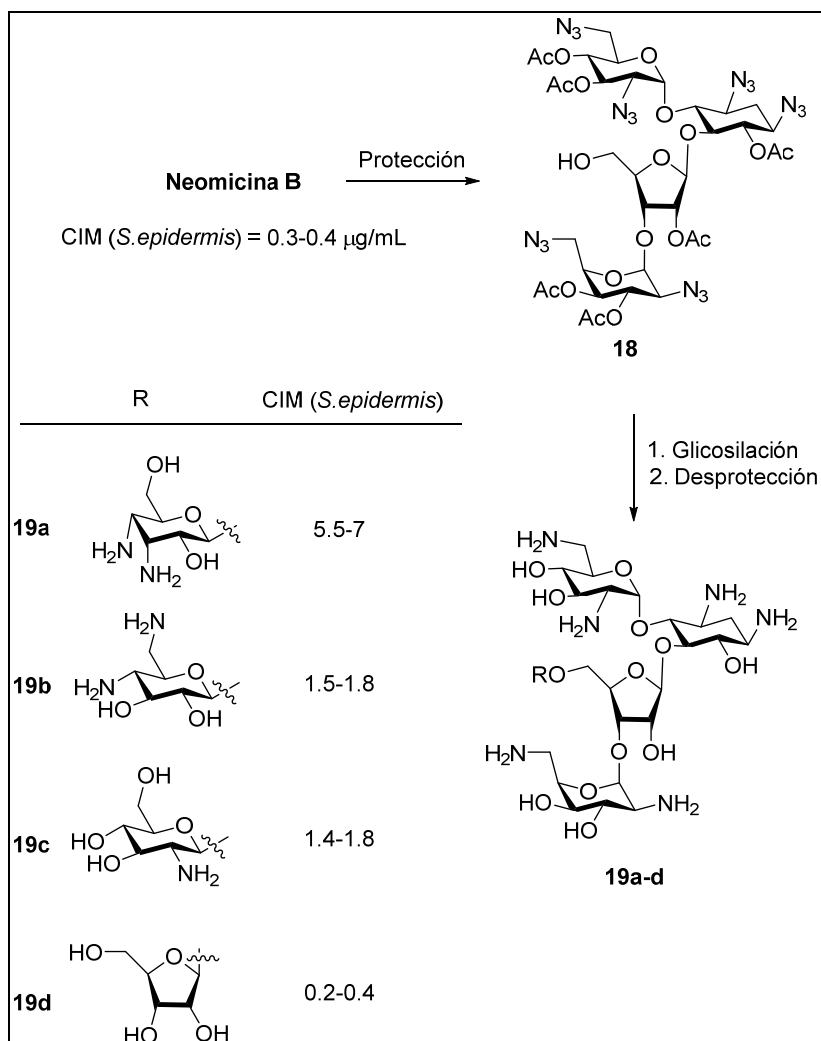
Esquema 1.8. Síntesis de derivados de ribostamicina y paromomicina mediante la introducción de cadenas amino-alquílicas.



En ambos casos la mejor actividad biológica se obtuvo cuando el resto R era una amina alquílica (**12**, **13** y **17**).

En el caso de la neomicina B se introdujeron nuevas unidades de carbohidrato en la posición la 5'' del anillo III.¹⁰⁶ La síntesis de estos compuestos se muestra en el esquema 1.9, siendo la etapa clave la reacción de glicosilación del derivado **18**.

Esquema 1.9. Síntesis de derivados de neomicina B mediante la introducción de azúcares adicionales.

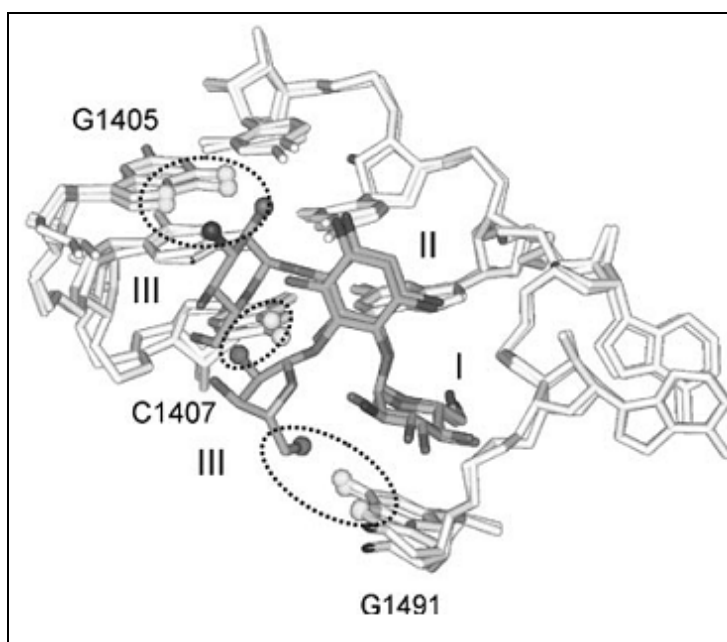


En lo que respecta a los datos biológicos se ha observado únicamente mejora de los valores de CIM para el derivado **19d** con respecto a la neomicina B. Este resultado indicó que otra posible vía para el diseño de nuevos antibióticos podría ser el aumento de la rigidez de la molécula mediante la introducción de azúcares adicionales, optimizando de este modo su interacción con el ARNr. Además, y tal como se ha demostrado posteriormente, la inclusión de estas unidades puede dificultar la unión de los ligandos a las enzimas modificadoras de aminoglicósidos, disminuyendo así la inactivación de los mismos.¹⁰⁷

Otra de las estrategias empleadas para la preparación de ligandos con mayor afinidad por el ARN ha sido la síntesis de derivados 4,5,6-trisustituídos en la 2-DOS.

La superposición de las estructuras cristalográficas del ARN con antibióticos de tipo 4,5 (ribostamicina) y 4,6-disustituídos (kanamicina B) (figura 1.36) ha permitido observar que en ambos tipos de ligandos los anillos I y II (neamina) adoptan una misma posición en el surco mayor, dando lugar a interacciones prácticamente idénticas con el ARN.

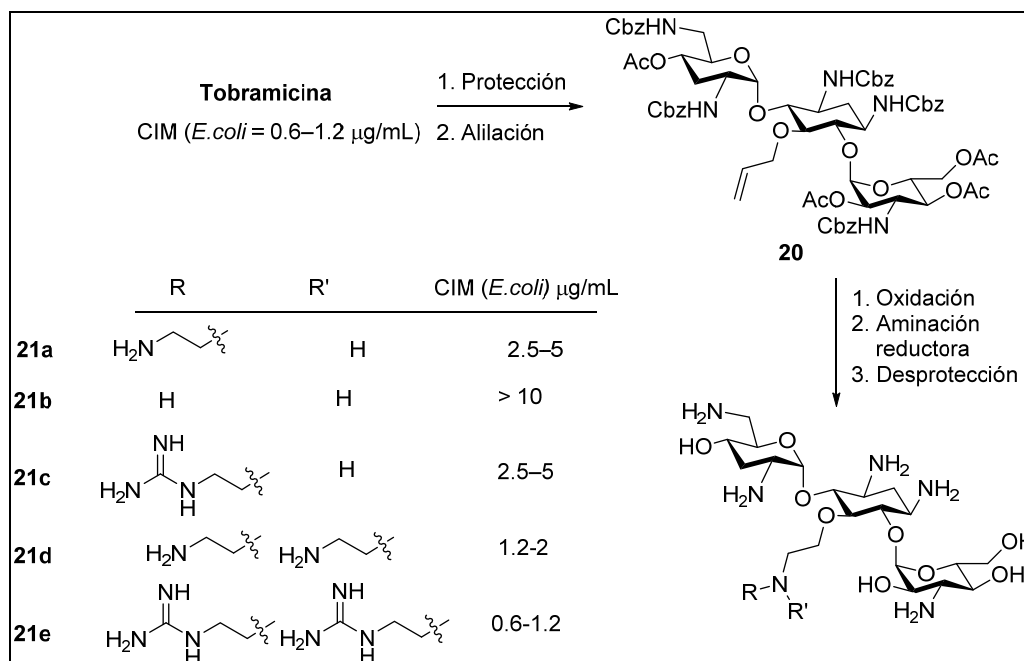
Figura 1.36. Superposición de las estructuras cristalográficas de la kanamicina-B y la ribostamicina en el sitio A.



Sin embargo el anillo III de kanamicina B y ribostamicina presentan orientaciones muy diferentes en el centro de reconocimiento, hecho que se ha aprovechado para la preparación de ligandos que pudieran presentar mayor afinidad y/o especificidad por el ARNr.

Los primeros aminoglicósidos de este tipo fueron preparados mediante la introducción de cadenas amino-alquílicas en la posición 5 del anillo de 2-DOS de tobramicina.¹⁰⁸ Su síntesis se muestra en el esquema 1.10. y como en los casos anteriores las cadenas se introdujeron por oxidación de un doble enlace y posterior aminación reductora.

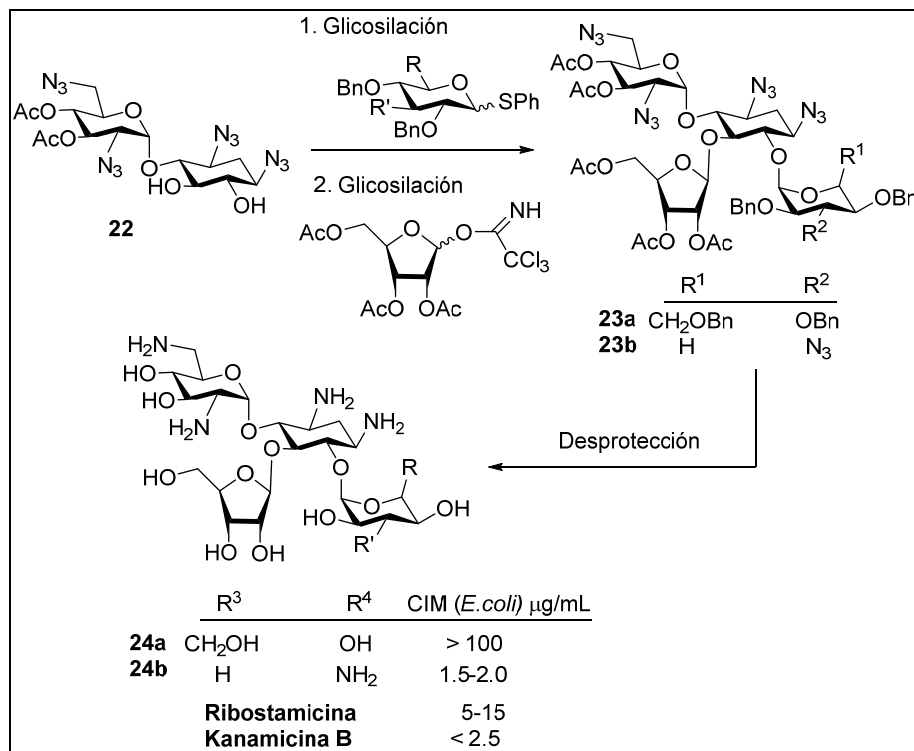
Esquema 1.10. Síntesis de derivados 4,5,6-trisustituídos mediante introducción de cadenas amino-alquílicas.



El derivado más activo de la serie preparada fue **21e**, manteniendo una actividad similar a la del antibiótico natural de partida, demostrando la utilidad de la aproximación.

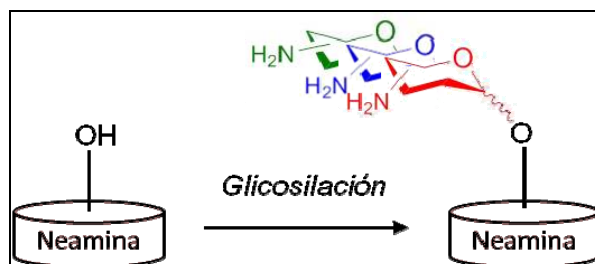
Siguiendo una estrategia similar en nuestro grupo de investigación hemos sintetizado híbridos de tipo ribostamicina-kanamicina.¹⁰⁹ La síntesis de estos derivados se muestra en el esquema 1.11, siendo las etapas claves las reacciones de glicosilación sobre el derivado de neamina **22**.¹¹⁰

Esquema 1.11. Síntesis de derivados 4,5,6-trisustituídos: híbridos ribostamicina-kanamicina B.



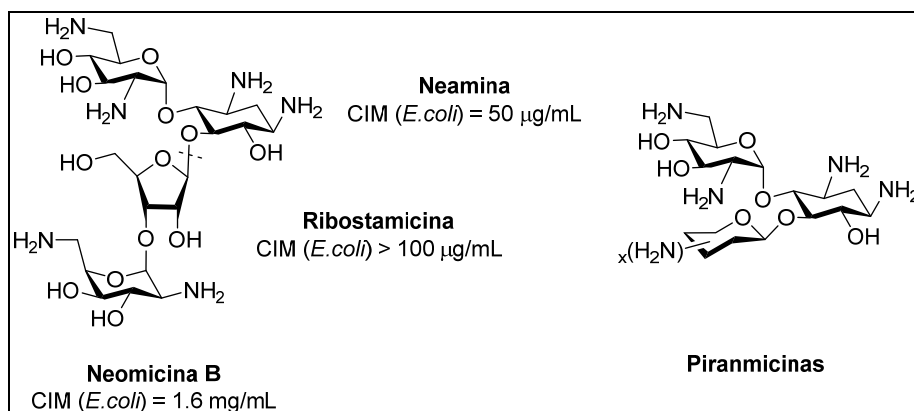
En lo que respecta a la actividad biológica el compuesto **24b** mejoró ligeramente la CIM de los antibióticos naturales ribostamicina y kanamicina B, lo que permitió demostrar de nuevo que una funcionalización adecuada de la posición 6 de la 2-DOS de ribostamicina resulta una buena estrategia para mejorar la actividad antibiótica de la misma.

Otra de las estrategias empleadas ha sido la glicodiversificación, que puede definirse como la introducción de diversidad sobre un cabeza de serie, en este caso la neamina, a través de reacciones de glicosilación, dando lugar a familias de compuestos con diferencias estructurales entre ellos en el anillo III del aminoglicósido (figura 1.37).¹¹¹

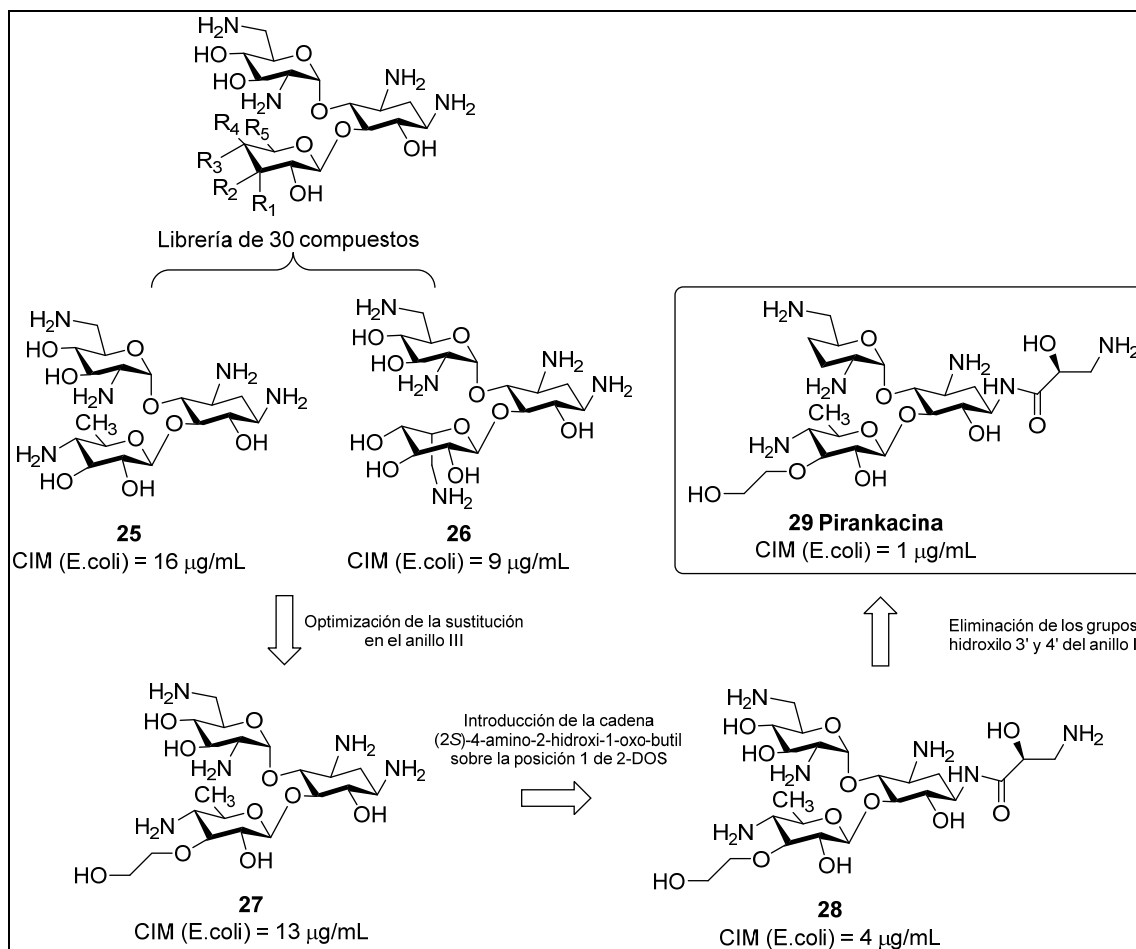
Figura 1.37. Esquema general de la glicodiversificación

La aplicación de esta estrategia ha permitido la preparación de una familia de aminoglicósidos denominados piranmicinas, cuya diferencia fundamental estriba en que la D-ribosa presente en la posición 5 de la 2-DOS ha sido sustituida por una L-piranososa.¹¹²

El diseño de estos compuestos ha sido realizado en base al hecho de que, tal como se observa en la figura 1.38, la neomicina B se degrada fácilmente en medio ácido dando lugar a la neamina (anillos I y II) mucho menos activa y a la neobiosamina (anillos III y IV) que no posee actividad antibiótica, debido a la labilidad del enlace glicosídico de un azúcar de tipo furanosa, como es el caso de la ribosa.¹¹³ Esta degradación hace necesario el empleo de dosis elevadas de antibiótico cuando se administra por vía oral para alcanzar la concentración efectiva terapéutica, pudiendo ser una de las causas de la elevada citotoxicidad de la neomicina B. A partir de esta hipótesis se ha descrito la síntesis de una gran cantidad de compuestos en los que el anillo III de tipo furanosa ha sido sustituido por amino-azúcares diversos de tipo piranososa con el objetivo de aumentar su estabilidad en medio ácido.

Figura 1.38. Degradación de la neomicina B en medio ácido y estructura general de la familia de antibióticos piranmicinas.

La búsqueda y caracterización de un cabeza de serie para el desarrollo de la familia de antibióticos piranmicinas se inició mediante la síntesis de una librería de 30 compuestos aplicando como estrategia la glicodiversificación sobre la posición 5 del anillo de 2-DOS con azúcares no naturales.^{112, 114} Este estudio llevó a la identificación de los compuestos **25** y **26** (esquema 1.12), los cuales mantenían su actividad antibiótica tanto antes como después del tratamiento de los mismos en medio ácido. A partir de estos compuestos se procedió a una optimización de los mismos mediante la introducción de cadenas amino-alquílicas sobre las posiciones 2'', 3'' ó 4'' del anillo III de las piranmicinas. Los estudios de actividad antibacteriana demostraron que únicamente resultaba efectiva la introducción de una cadena de 2-hidroxi-etilo en la posición 3'' del compuesto **25**, obteniéndose el derivado **27**.¹¹⁵ Mas adelante se introdujo sobre la posición 1 del anillo de 2-DOS la cadena de (2*S*)-4-amino-2-hidroxi- 1-oxobutil] (**28**) para, finalmente, eliminar los grupos hidroxilo de las posiciones 3' y 4' del anillo I. Todas estas modificaciones dieron lugar a un nuevo antibiótico que fue denominado pirankacina (**29**),¹¹⁶ que a pesar de que presentó buena actividad antibiótica no presentaba buenas propiedades farmacológicas, no superando la fase 0 de los ensayos clínicos.

Esquema 1.12. Desarrollo del antibiótico pirankacina

Otra de las aproximaciones que ha sido utilizada por varios grupos de investigación para incrementar la afinidad de unión es la obtención de dímeros de aminoglicósidos, con la estructura general que se muestra en la figura 1.39.

Figura 1.39. Estructura general de los dímeros de aminoglicósidos.



Se han sintetizado homo- y heterodímeros (con los dos aminoglicósidos iguales o diferentes) con aminoglicósidos naturales tales como la kanamicina A, tobramicina y neomicina B, utilizando espaciadores de muy diversa naturaleza.^{98c, 117}

En lo que respecta a su actividad biológica se ha comprobado que la dimerización de los aminoglicósidos con espaciadores de apropiada longitud mejora su

unión a diferentes tipos de ARNs incluyendo el ribozima HH16,¹¹⁸ el tRNA^{Phe},¹¹⁹ un dímero del sitio A,^{117c} el ribozima de Tetrahymena^{117a} y un dominio del ARN del HIV-1.¹²⁰

A la vista de estos buenos resultados obtenidos por la introducción de dos ligandos de ARN, en el caso de los dímeros dos moléculas de aminoglicósido, en una misma molécula recientemente ha surgido una nueva aproximación consistente en la heteroconjugación de aminoglicósidos con diferentes ligandos conocidos del ARN, con la estructura general que se muestra en la figura 1.40.

Figura 1.40. Estructura general de los heteroconjugados aminoglicósido-ligando de ARN



Como en el caso de los dímeros se han empleado diversos aminoglicósidos naturales con espaciadores diversos. En lo que respecta al nuevo ligando de ARN existen ejemplos en la bibliografía de péptidos,¹²¹ nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs),^{121c, 122} unidades hidrofóbicas^{105, 123} y antibióticos de otras familias.^{123b, 124}

1.2.6.2.2. Derivados de aminoglicósidos para vencer los fenómenos de resistencia.

La sobreexpresión de las enzimas modificadoras de antibióticos en cepas bacterianas resistentes es el modo de resistencia más comúnmente encontrado en el caso de los aminoglicósidos, tal como se recoge en el apartado 1.2.4. de esta Memoria, habiéndose aislado más de 50 enzimas diferentes en el ámbito hospitalario.

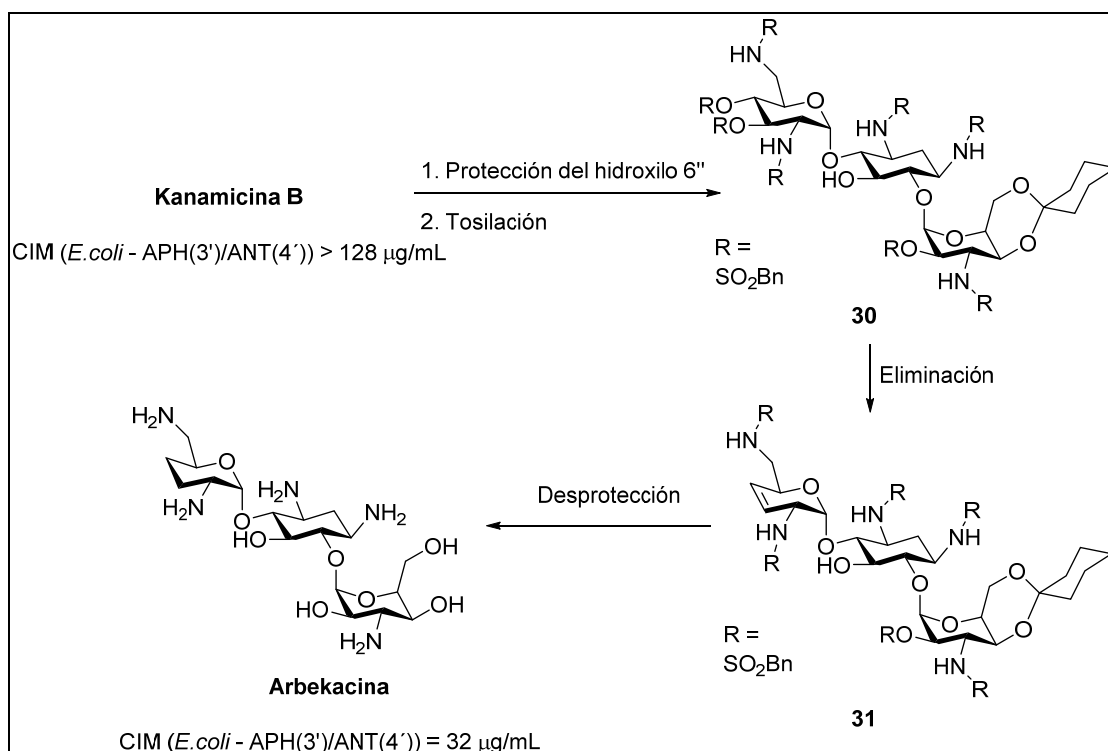
Por este motivo, durante los últimos 30 años muchos han sido los antibióticos sintetizados con el objetivo de evitar la acción de estas enzimas.

Una de las estrategias más simple para la obtención de derivados no susceptibles a la inactivación enzimática desde un punto de vista conceptual es, probablemente, la eliminación o modificación de los grupos reactivos que son alterados por el enzima,

siendo únicamente posible su aplicación en aquellos casos en los que dichas funciones no sean clave en la interacción con el ARNr.

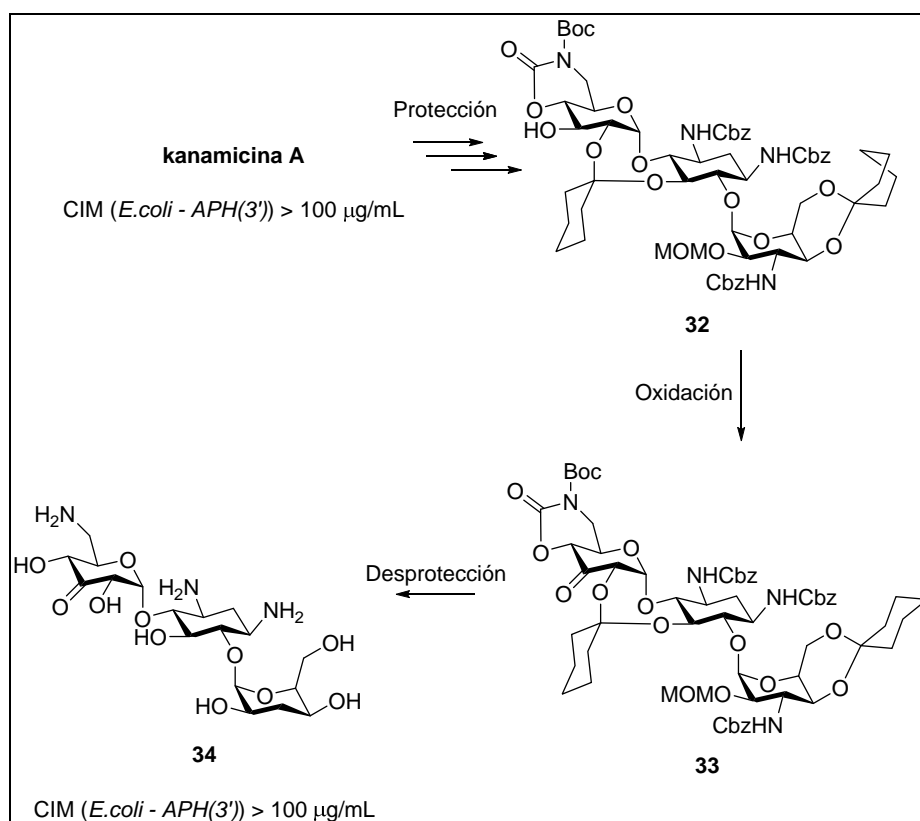
De hecho, la desoxigenación de las posiciones 3' y/o 4' ya fue descrita en la década de los setenta.¹²⁵ Además el éxito de la misma llevó al descubrimiento de nuevos antibióticos naturales como la tobramicina¹²⁶ y a la preparación de algunos antibióticos semi-sintéticos como, por ejemplo, la arbekacina (3',4'-didesoxi-kanamicina B), que ha sido empleado en clínica durante muchos años.¹²⁷ Los métodos tradicionalmente descritos para la preparación de este tipo de compuestos tienen como etapa clave la transformación de los hidroxilos 3' y 4' en buenos grupos salientes y su posterior eliminación.¹²⁸ En el esquema 1.12 se muestra a modo de ejemplo la síntesis de la arbekacina a partir de la kanamicina B. La protección de las posiciones 6'' y 4'' del anillo III de kanamicina B, seguido de una tosilación del resto de grupos funcionales, permitió la obtención de **30**. En una siguiente etapa se llevó a cabo la eliminación entre las posiciones 3' y 4' del anillo I lo que dio lugar al compuesto **31**, que finalmente fue desprotegido.

Esquema 1.13. Síntesis de la arbekacina



En lo que respecta a la modificación puntual del grupo funcional presente en la posición en la que se produce la inactivación enzimática pocos son los ejemplos descritos en la bibliografía. Uno de los más relevantes es la preparación de un derivado con un grupo cetona en posición 3' del anillo I, cuya síntesis se muestra en el esquema 1.14.¹²⁹ Tras varias etapas de protección-desprotección se obtuvo el compuesto **32** que fue oxidado, obteniendo el 3-ceto-derivado **33**. La posterior desprotección dio lugar al derivado **34**, que no recuperó la actividad antibiótica. Sin embargo, **34** resultó ser un buen inhibidor de la APH(3')-Ia y APH(3')-IIa, ya que aunque inicialmente **34** es fosforilado ($k_{cat}/k_m = 7 \times 10^4$ y $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ respectivamente) en una etapa posterior se produce la eliminación del grupo fosfato.

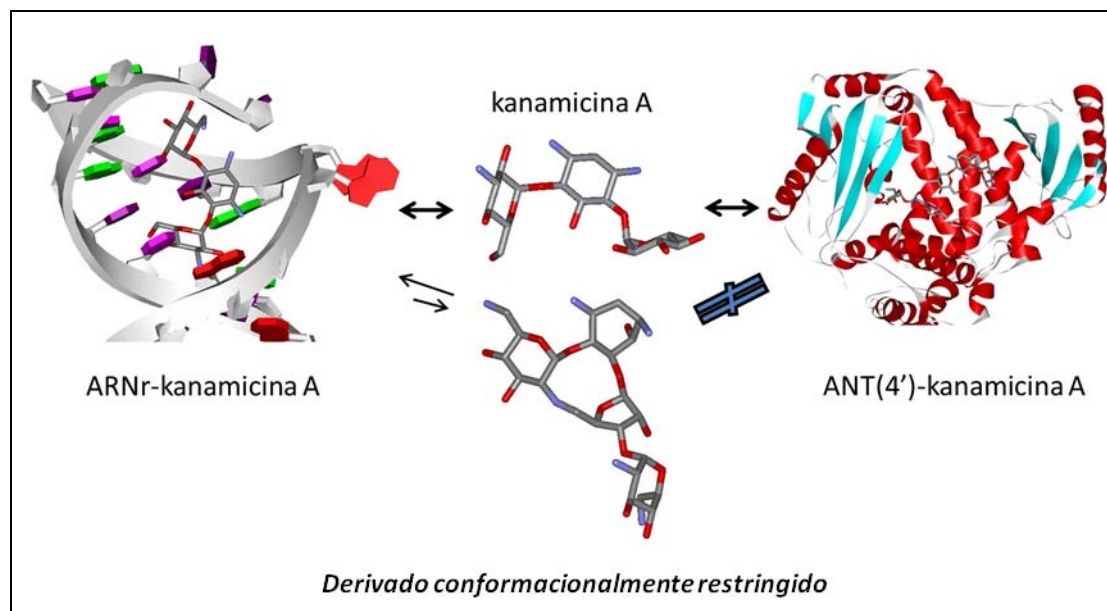
Esquema 1.14. Ejemplo de modificación puntual de una posición para evitar la inactivación enzimática



Otra aproximación utilizada en varias ocasiones ha sido la preparación de los denominados aminoglicósidos conformacionalmente restringidos, cuyo diseño se ha llevado a cabo teniendo en cuenta que los aminoglicósidos adquieren conformaciones diferentes en el complejo con ARNr y con las enzimas modificadoras respectivamente. De este modo, si es posible bloquear la conformación bioactiva, es decir, aquella

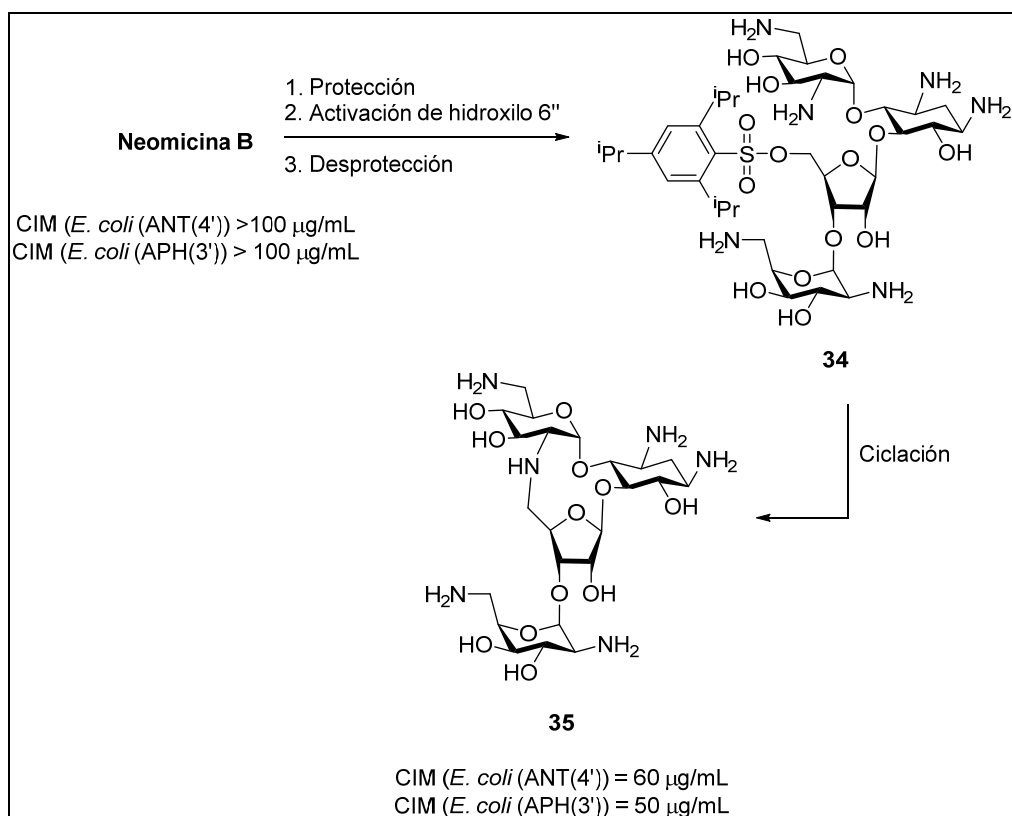
observada con el ARNr, el aminoglicósido no podrá adquirir la conformación necesaria para unirse a las enzimas, evitando así su inactivación (esquema 1.41).¹³⁰

Figura 1.41. Aminoglicósidos conformacionalmente restringidos



De entre los diversos derivados preparados uno de los más activos ha sido el derivado de neomicina B conformacionalmente restringido por la formación de un ciclo entre las posiciones 6'' del anillo III y la 2' del anillo I.¹³¹ La síntesis de este compuesto se muestra en el esquema 1.15, siendo la etapa clave la formación del ciclo a partir de **35** mediante una sustitución nucleófila sobre la posición 6'' del anillo III, actuando como nucleófilo el amino 2' del anillo I, obteniendo el derivado de neomicina B **36**.

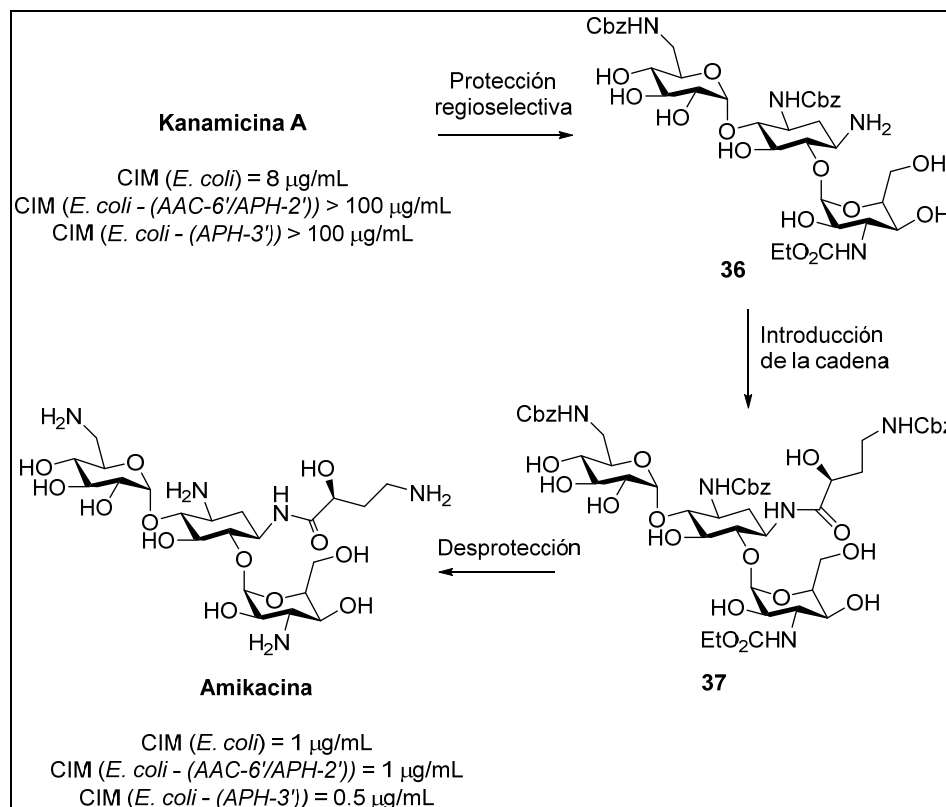
Esquema 1.15. Síntesis de derivados conformacionalmente restringidos.



Finalmente, varios de los ejemplos más exitosos para la preparación de antibióticos no susceptibles de las enzimas de resistencia se han centrado en la modificación covalente del grupo amino situado en la posición 1 del anillo II.¹³²

Esta estrategia ha llevado al descubrimiento del aminoglicósido semi-sintético amikacina obtenido a partir de la kanamicina A. La protección regioselectiva de los grupos amino del antibiótico natural se llevó a través de la quelación con metales de transición, en este caso Zn(II), obteniendo el compuesto **36**, sobre el que se introdujo la cadena de 4-amino-2-hidroxibutiril (AHB) en la posición 1 del anillo de 2-DOS (**37**), para finalmente eliminar los grupos protectores (esquema 1.16).¹³³

Este antibiótico ha sido ampliamente utilizado en clínica, ya que mantiene la actividad antibiótica incluso en cepas resistentes. Sin embargo, su uso continuado en el ámbito hospitalario ha dado lugar al desarrollo de resistencia, lo que ha llevado a que hoy en día este compuesto tenga menor utilidad.

Esquema 1.16. Síntesis de la amikacina.**1.2.6.3. Perspectivas futuras.**

Con el aumento de los casos infecciosos en el ámbito hospitalario causadas por cepas multi-resistentes, especialmente las originadas por bacterias Gram(-), el interés por los antibióticos aminoglicósidos para su uso en clínica se ha reavivado y ha llevado al resurgir de un campo que poco a poco se estaba olvidando.¹³⁴

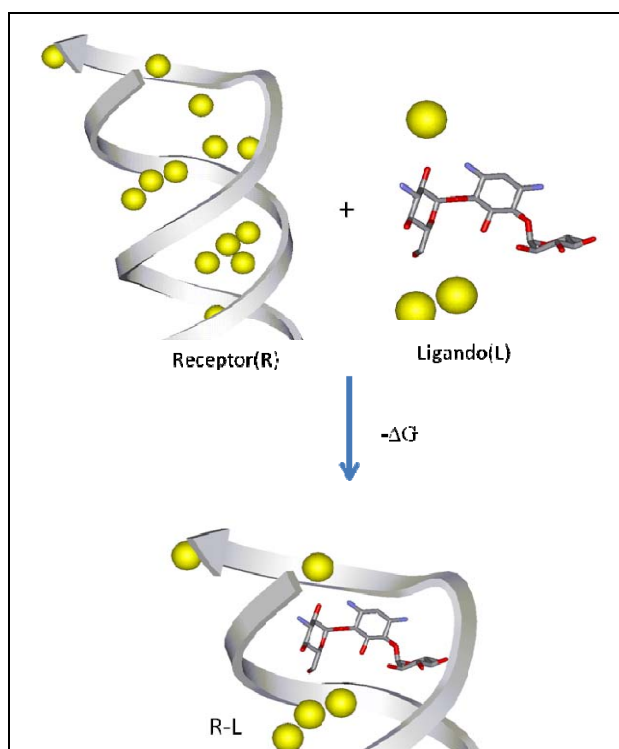
En la actualidad se está investigando principalmente en evitar la resistencia a través del bloqueo de los centros activos de las enzimas o diseñando inhibidores enzimáticos,¹³⁵ ajustando la farmacología de los antibióticos,¹³⁶ accediendo a nuevos modos de unión,¹³⁷ y entendiendo y evitando la toxicidad de los mismos, principalmente la ototoxicidad¹³⁸ y la nefrotoxicidad.¹³⁹ Además trabajos recientes han abierto la posibilidad al empleo de este tipo de derivados, debido a su capacidad de interacción con el ARN, como agentes anti-virales^{134a} y como fármacos para el tratamiento de ciertas enfermedades genéticas.¹⁴⁰

De entre los nuevos aminoglicósidos sintetizados en los últimos años uno de los más avanzados es el Plazomicin, formalmente llamado ACHN-490,¹⁴¹ tal como queda recogido en el capítulo 3 de esta Memoria.

1.2.7. Estudios de reconocimiento molecular “*in silico*” de antibióticos aminoglicósidos con ARNr.

El reconocimiento molecular juega un papel fundamental en todos los procesos biológicos. Por este motivo, muchos han sido los esfuerzos realizados para comprender y predecir las interacciones ligando-receptor. La obtención de un ligando (aminoglicósido) que pueda potencialmente unirse a un receptor (ARNr o EMAs) es esencial en el descubrimiento de nuevos antibióticos, pero dicho estudio requiere un gran esfuerzo económico y muchos años de investigación. Dichos inconvenientes se pueden reducir mediante el uso de las herramientas computacionales (*in silico*), las cuales son frecuentemente usadas por empresas farmacéuticas para encontrar nuevos fármacos a partir de una gran librería de compuestos ya conocidos. Si la estructura 3D del receptor es conocida se puede llevar a cabo este estudio de reconocimiento molecular usando docking.

Figura 1.42. Concepto de docking

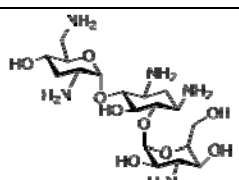
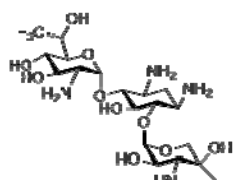
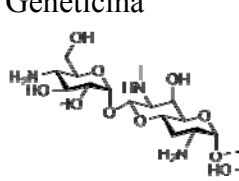


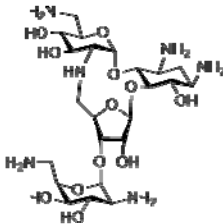
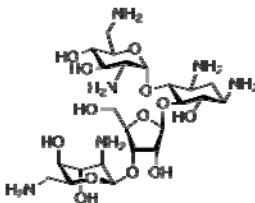
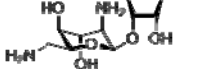
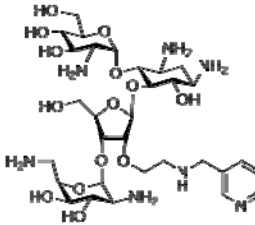
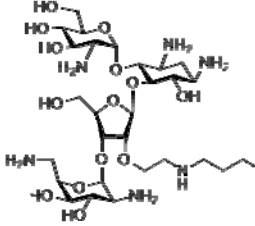
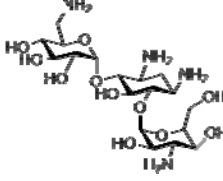
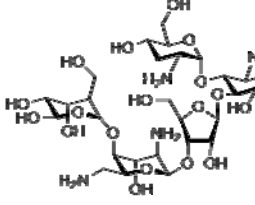
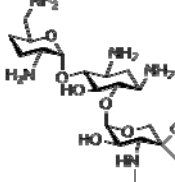
El objetivo de este procedimiento de modelado molecular es predecir los modos de unión del ligando en el sitio de unión de la proteína o receptor también como identificar esos modos de unión con respecto a su fuerza de interacción en un fragmento de tiempo y puede hacerse con diferentes programas (Surflex, LigandFit, Glide, GOLD, FlexX, eHiTS, o AutoDock).¹⁴² En general se suele considerar el receptor fijo, dando flexibilidad al ligando.

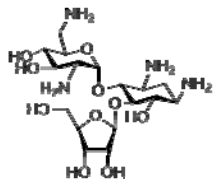
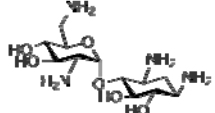
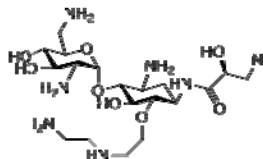
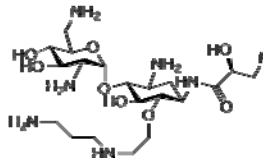
En la bibliografía hay muy pocos ejemplos de estudio computacional de complejos entre aminoglicósidos y ARNr, ya que la mayoría de estos programas están ajustados a uniones de tipo ligando-proteína, pero no ligando-ácidos nucleicos.¹⁴³

De hecho para el caso concreto de docking después de una búsqueda bibliográfica exhaustiva únicamente hemos encontrado una publicación de Hanessian y col. del año 2006 sobre el estudio teórico de los complejos aminoglicósido-ARNr, utilizando Autodock como programa para el cálculo.^{143b} En él se estudiaron computacionalmente todos los complejos aminoglicósidos-ARNr cuya estructura cristalográfica había sido descrita hasta la fecha (tabla 1.3).

Tabla 1.3. Complejos aminoglicósido-ARN (pdb), n° moléculas de agua a una distancia de menos de 3Å y resolución en Å del cristal.

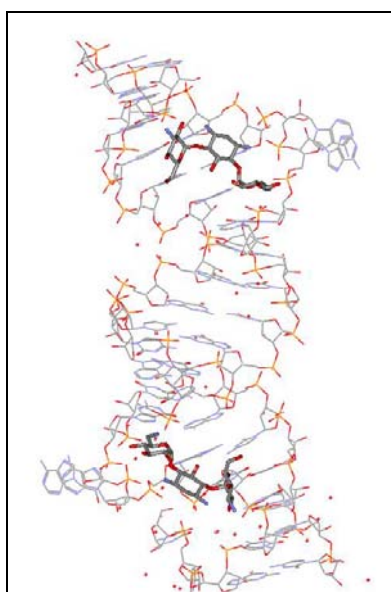
Aminoglicósido	N° de moléculas de agua	PDB	Resolución	Referencia
 Tobramicina	5	1LC4	2.54	70a
 Geneticina	3	1MWL	2.40	144
 Apramicina	4	1YRJ	2.70	145

35		2	1ZZ5	3.00	130a
		0	2A04	2.95	146 65b ,
		4	2ET4	2.40	
Neomicina B					
14		2	2BE0	2.63	105
		8	2BEE	2.60	105
13		2	2ESI	3.00	65b
	Kanamicina A				
		3	2ESJ	2.20	65b
Lividomicina					
		0	2ET3	2.80	65b
Gentamicina C1a					

38		2	2ET5	2.20	65b
	Ribostamicina				
		2	2ET8	2.50	147
	Neamina				
39		0	2F4T	3.00	147
		2	2F4U	2.60	147

El trabajo consta de dos partes, dependiendo de si el ARNr se mantiene fijo o si, por el contrario, se le da flexibilidad. En la primera, inicialmente se llevó a cabo un blanco (self-docking) con el objetivo de validar el método de cálculo. Para ello se estudió el complejo de la kanamicina A con el ARNr, utilizando como macromolécula el ARNr co-cristalizado con este mismo antibiótico (pdb: 2esi, figura 1.43). En este caso se obtuvo una desviación RMDS de 2.27 Å y un éxito del 56%.

Figura 1.43. Complejo 3D kanamicina A-ARN.



Cuando se utilizó un ARNr diferente al co-cristalizado, es decir, se llevó a cabo un docking cruzado (cross-docking) los resultados obtenidos no fueron tan buenos, obteniéndose una desviación RMSD de 3.25 Å y un éxito del 48%. Estos datos pusieron de manifiesto que la conformación del ARNr cristalizado es crítica, existiendo variaciones entre las diferentes macromoléculas cristalizadas de entre 0.5 y 1.6 Å.

En el caso en el que se consideraba el ARNr como una macromolécula flexible el resultado obtenido no mejoró con respecto al obtenido al considerar el ácido nucleico como una entidad fija, obteniéndose un éxito del 56%. Sin embargo, esta modificación supuso un crecimiento exponencial en el tiempo de cálculo necesario.¹⁴⁸

Finalmente, la implementación de un nuevo potencial en el que se controla el número de moléculas de agua mejoró considerablemente los resultados, obteniendo para el caso del docking cruzado una desviación RMSD de 1.41 Å.



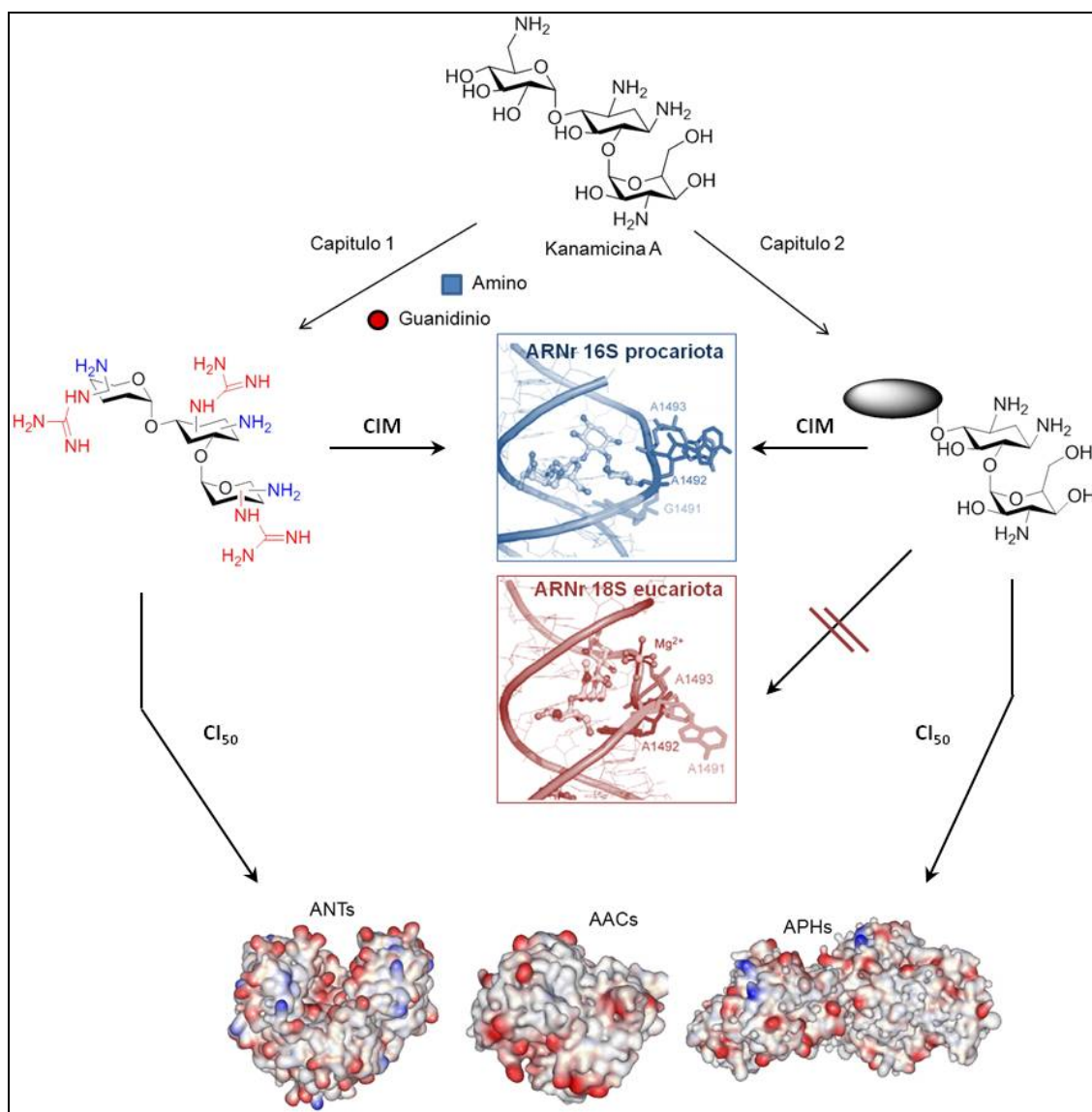
Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos

El trabajo descrito en esta Memoria de Tesis se centra en la modificación química de aminoglicósidos para la obtención de nuevos antibióticos. Así se llevara a cabo el diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados de tipo kanamicina que puedan actuar como antibióticos mediante su unión a la diana biológica de este tipo de compuestos el ARNr (CIM), y/o como inhibidores de las enzimas de resistencia, mediante la unión a éstas (CI_{50})(figura 2.1), evitando a su vez la unión al ARNr eucariota, o lo que es lo mismo disminuyendo la toxicidad de los mismos.

Figura 2.1. Modificación química de antibióticos de tipo aminoglicósido.

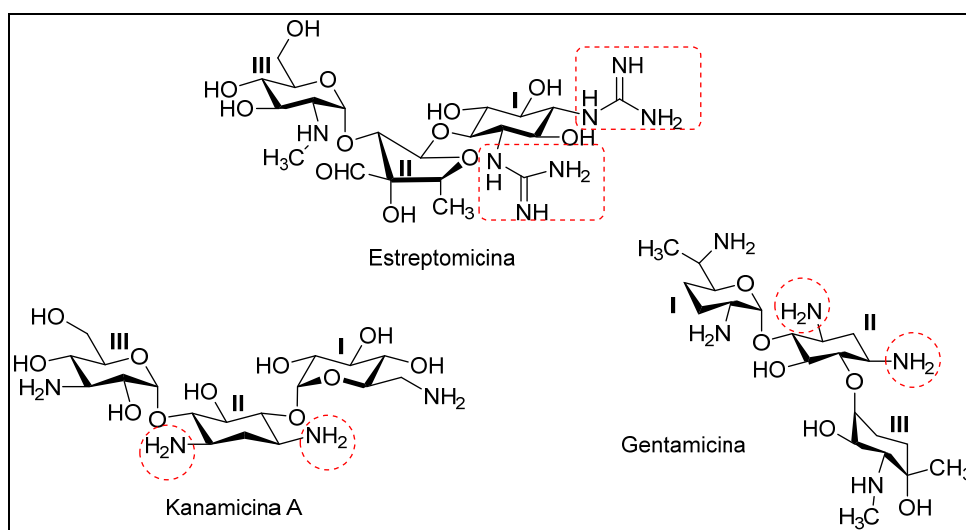


Más concretamente, tal como se muestra en la figura 2.1, esta Memoria está dividida en dos partes, que se corresponden con los dos objetivos de la tesis doctoral:

2.1. Capítulo 3.- Guanidino-glicósidos: Una nueva familia de antibióticos.

Como puede verse en la Figura 2.2 la estreptomicina presenta en el anillo de ciclitol dos grupos de tipo guanidinio, mientras que en el caso de los 4,6-aminoglicósidos (Kanamicina A y Gentamicina C1a) son dos grupos aminos.

Figura 2.2. Estructura de la estreptomicina, kanamicina A y gentamicina C1a.



Si consideramos que la unión del antibiótico aminoglicósido al ARNr tiene lugar fundamentalmente a través de interacciones electrostáticas de las cargas negativas de la diana (grupos fosfatos del ARN) con las positivas de la molécula bioactiva (grupos aminos), una posible estrategia para aumentar dicha afinidad podría ser incrementar el número de cargas positivas.

Los guanidinos, debido a sus propiedades químico-físicas presentan por un lado una mayor basicidad que los grupos amino y, además, una mejor capacidad para dar y aceptar enlaces de hidrógeno, hecho fundamental en el proceso de reconocimiento químico del aminoglicósido tanto con el ARN como con las enzimas de resistencia. Por este motivo la sustitución total o parcial de los grupos amino de los aminoglicósidos por guanidinos podrían incrementar la carga neta positiva del antibiótico a pH fisiológico y, si esto fuera bien tolerado por el receptor podría posiblemente dar lugar a un incremento

en la fuerza de unión al ARNr, viéndose modificada la interacción con las enzimas de resistencia (Figura 2.1).

Con el objeto de verificar esta hipótesis, en esta primera parte de la tesis se llevará a cabo un estudio exhaustivo sobre el efecto que tiene la sustitución de los diferentes grupos amino del antibiótico natural kanamicina A por grupos guanidinio, para posteriormente aplicarlo sobre un aminoglicósido empleado en clínica, la gentamicina.

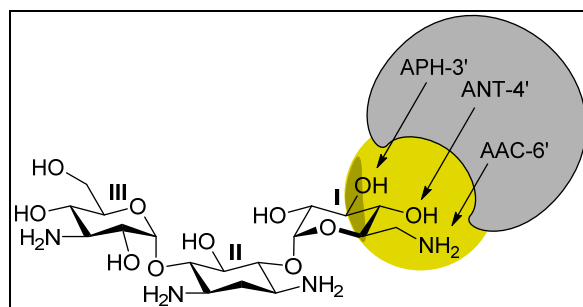
2.2. Capítulo 4.- Un nuevo 4,6-aminoglicósido para su unión selectiva al sitio 16S ARNr procariota.

La elevada toxicidad de los aminoglicósidos unido a la aparición de fenómenos de resistencia han sido los dos factores que han llevado a que estos compuestos hayan dejado de utilizarse en clínica.

Recientemente se ha descrito que uno de los factores implicados en la toxicidad es la unión de estos compuestos no sólo al sitio A del ARNr procariota (16S) sino también al sitio A del ARNr citoplasmático eucariota (18S). Esto se debe a la gran similitud existente entre ellos, difiriendo fundamentalmente en la A1408 que en el caso del ARNr eucariota está sustituida por la G1408, siendo en ambos casos estos residuos claves en la unión del aminoglicósido.

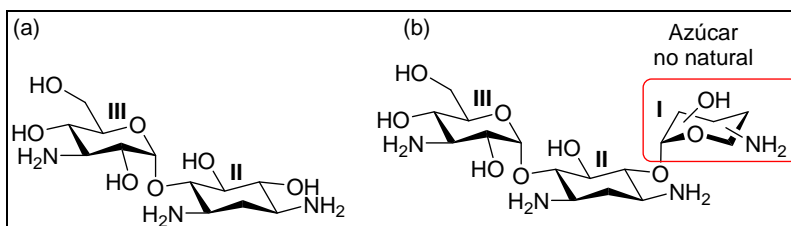
Por este motivo una posible estrategia para la obtención de nuevos aminoglicósidos sería la preparación de antibióticos que no interaccionen con la G1408. Para ello una posibilidad sería la modificación del anillo I de los aminoglicósidos si consideramos que el anillo I es clave en la interacción con la G1408 del ARNr eucariota.

Además, si se tiene en cuenta que este anillo es el que sufre el mayor número de modificaciones en los procesos de inactivación enzimática, la introducción de variaciones puede resultar beneficiosa para evitar la resistencia.

Figura 2.3. Modificaciones enzimáticas del anillo I de kanamicina A más habituales.

A la vista de estos datos, una aproximación para reducir la toxicidad y evitar la inactivación enzimática sería la sustitución del anillo I de kanamicina A por otro azúcar no natural. En particular, en este capítulo de la Tesis nos hemos planteado dos objetivos (figura 2.4):

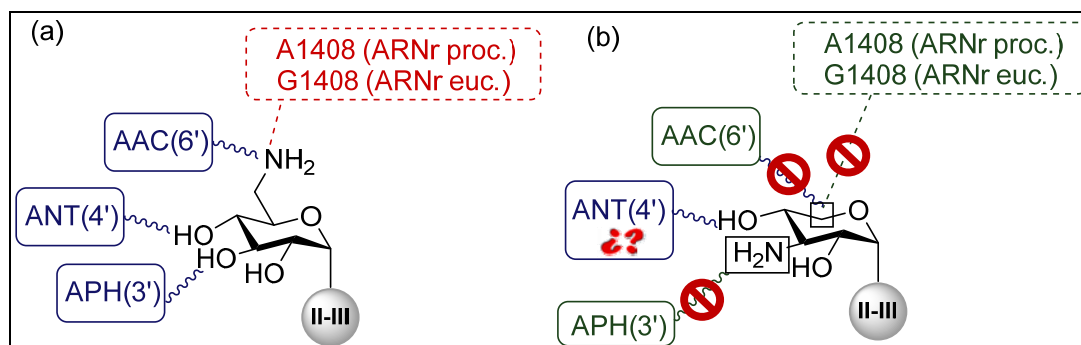
Figura 2.4. (a) Objetivo 1: Fragmento anillo II/III de kanamicina A y (b) Objetivo 2: Nuevos aminoglicósidos propuestos



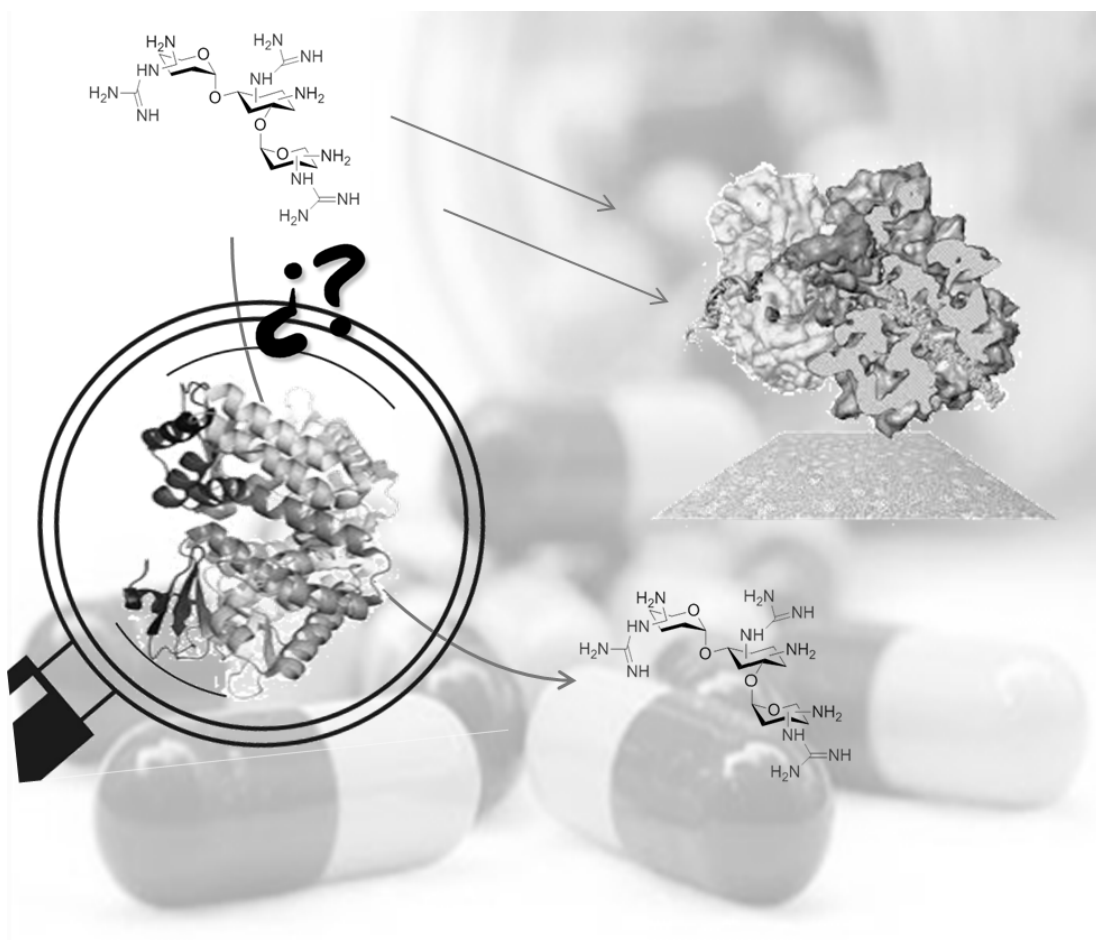
1. Síntesis del pseudo-disacárido constituido por los anillos II y III y estudio de su actividad biológica con objeto de utilizar este fragmento como farmacóforo en el diseño de nuevos aminoglicósidos (figura 2.4a).

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos 4,6-aminoglicósidos con modificaciones en el anillo I (figura 2.4b).

Figura 2.5.(a) Posiciones del anillo I de kanamicina A claves en la unión al ARNr eucariota y procariota (rojo) y modificables por las enzimas de resistencia (azul).
(b) Modificaciones propuestas en este capítulo para evitar la interacción con el ARNr eucariota y la inactivación enzimática (verde).



En particular, en este capítulo nos hemos propuesto introducir las modificaciones que se muestran en la figura 2.5b, evitando hipotéticamente la inactivación enzimática de las posiciones 6', 4' y 3' y la interacción con la G1408 del ARNr eucariota que tiene lugar a través del amino de la posición 6'.



Capítulo 3

**Guanidinio-glicósidos:
Una nueva familia de
aminoglicósidos.**

3.1. Introducción

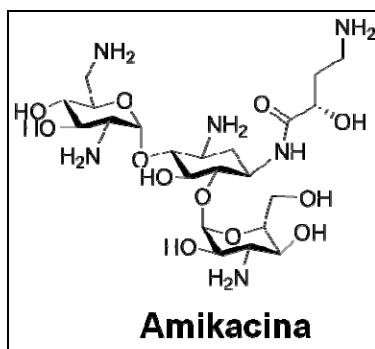
Los aminoglicósidos son antibióticos muy potentes para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram-(+) y Gram-(-).³³ Sin embargo, la aparición de los fenómenos de resistencia⁴³ y su alta toxicidad¹⁴⁹ hicieron que estos compuestos cayeran en desuso durante los años 1990.

A pesar de ello durante la última década muchos han sido los esfuerzos realizados por diversos grupos de investigación para la preparación de nuevos compuestos de tipo aminoglicósido inmunes a la inactivación enzimática y con toxicidad reducida.^{134a}

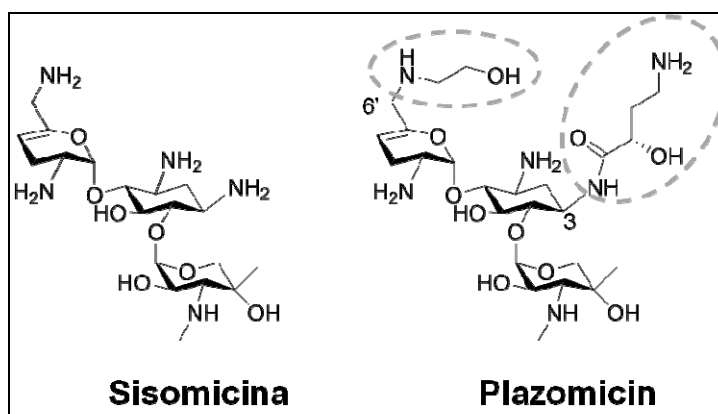
A la vista de los resultados obtenidos hasta la fecha, la mejor aproximación para la preparación de este tipo de ligandos ha sido, sin lugar a duda, la modificación puntual de los grupos aminos presentes en su estructura.¹⁵⁰

De hecho el aminoglicósido semisintético más utilizado en clínica es un derivado 1-N-(2*S*)-hidroxi-4-aminobutiril de la kanamicina B, llamado amikacina (figura 3.1).¹⁵¹

Figura 3.1. Estructura del antibiótico semi-sintético amikacina.

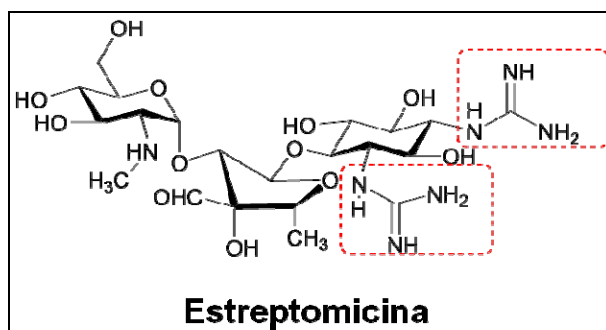


Además el único aminoglicósido que se encuentra en fase clínica (fase II) en la actualidad es el Plazomicin (ACHN-490), un derivado semi-sintético de la sisomicina obtenido mediante la introducción de sustituyentes sobre los aminos 6' del anillo I y 3 de la 2-DOS (figura 3.2).

Figura 3.2. Estructura química de la sisomicina y el plazomicin

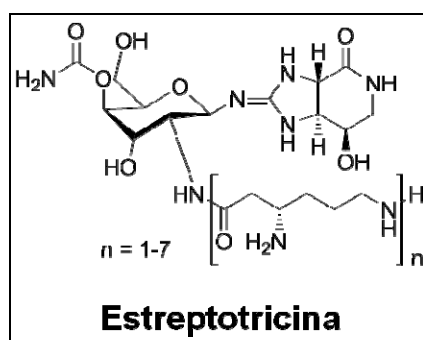
El éxito alcanzado por esta aproximación, la modificación de los grupos amino no resulta extraña si se tiene en cuenta la importancia de estas funciones tanto en la actividad biológica como en su modificación enzimática. La presencia en gran número de estos grupos funcionales hace que este tipo de derivados en condiciones fisiológicas se encuentren altamente cargados, lo que a su vez permite que tengan alta afinidad por el ARN ribosómico, su diana fisiológica. Por otro lado los grupos aminos son susceptibles a modificaciones por las enzimas de la familia N-acetil-transferasas, que mediante una simple acetilación regioselectiva con Ac-CoA inactiva el antibiótico.

La importancia de este grupo hace que en la mayoría de los aminoglicósidos encontremos entre 4 y 6 aminos. La única excepción a esto la constituye la estreptomicina, el primer aminoglicosido descubierto (figura 2.3), que en lugar de grupos amino presenta grupos guanidinio en su estructura.

Figura 3.3. Estructura química de la estreptomicina

Aunque en los aminoglicósidos la presencia de este grupo funcional está limitada a este caso, sin embargo, se trata de un motivo estructural frecuentemente encontrado en productos naturales. Un ejemplo de esto son las estreptotricinas, antibióticos de amplio espectro con un grupo guanidinio en su estructura (figura 3.4) que inhiben la síntesis de proteínas con un mecanismo similar al de los antibióticos aminoglicósidos.

Figura 3.4. Estructura química de la estreptotricina



Estos datos parecen indicar que la presencia de unidades de guanidinio en compuestos antibióticos con este mecanismo de acción es tolerada por el receptor. A esto hay que añadir que hasta la fecha no se han encontrado enzimas que modifiquen este grupo funcional ni en la estreptomicina ni en las estreptotricinas.

Finalmente se ha demostrado que la presencia de este grupo funcional no influye en la nefrotoxicidad de los compuestos, hecho que si ocurre en el caso de los grupos amino.

Por todas estas razones, una posible estrategia para la preparación de nuevos ligandos de tipo aminoglicósido sería la sustitución total o parcial de los grupos amino por grupos guanidinio.

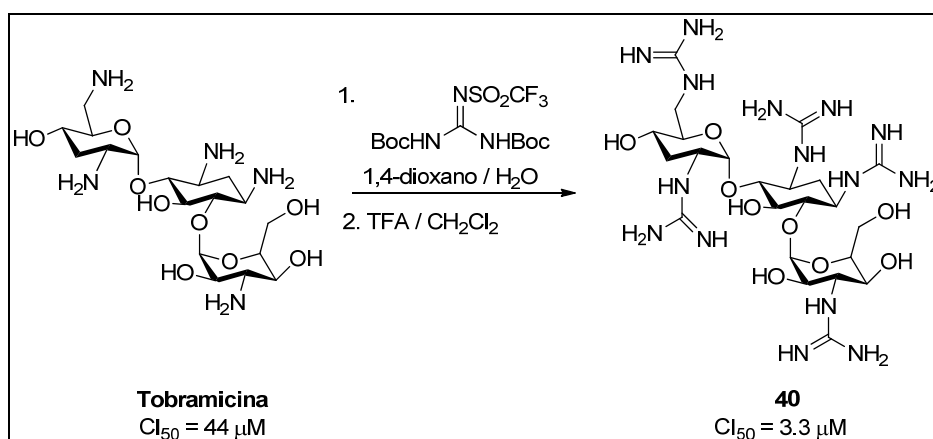
3.2. Antecedentes y objetivos.

3.2.1. Antecedentes

En el año 2000 Tor y col. emplearon como estrategia la sustitución de los grupos amino por guanidinos en aminoglicósidos para la preparación de nuevos ligandos del ARN vírico. A modo de ejemplo en el esquema 3.1 se presenta la síntesis de la penta-N-

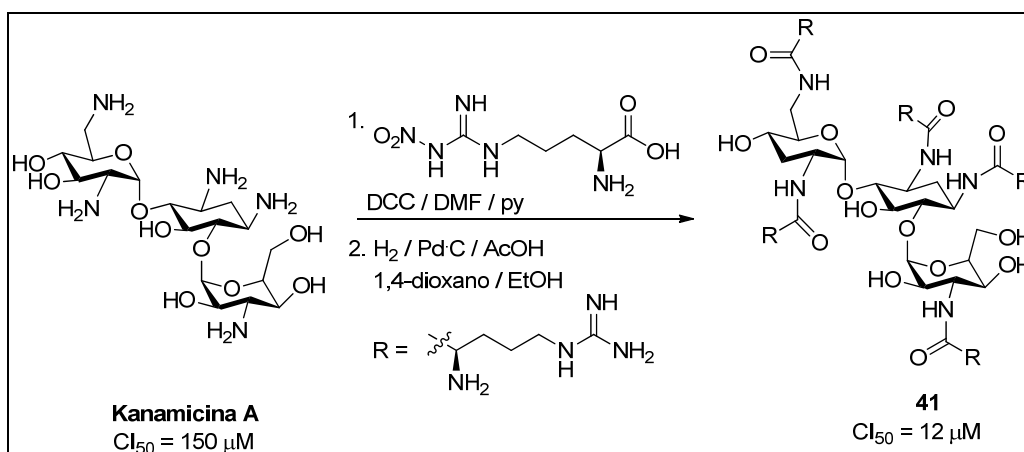
guanidino-tobramicina (**40**) y su actividad biológica como inhibidor de la replicación del VIH, observándose una mejora considerable frente al compuesto natural tobramicina.¹⁵²

Esquema 3.1. Síntesis de la penta-*N*-guanidino-tobramicina **40** y su actividad biológica.



Siguiendo una aproximación similar, ese mismo año Lapidot y col. prepararon la tetra-(γ -guanidino-butírico)-kanamicina A (**41**) según se muestra en el esquema 3.2.^{121a, 153} Este compuesto presentó, al igual que el derivado **40** actividad inhibitoria frente al VIH.

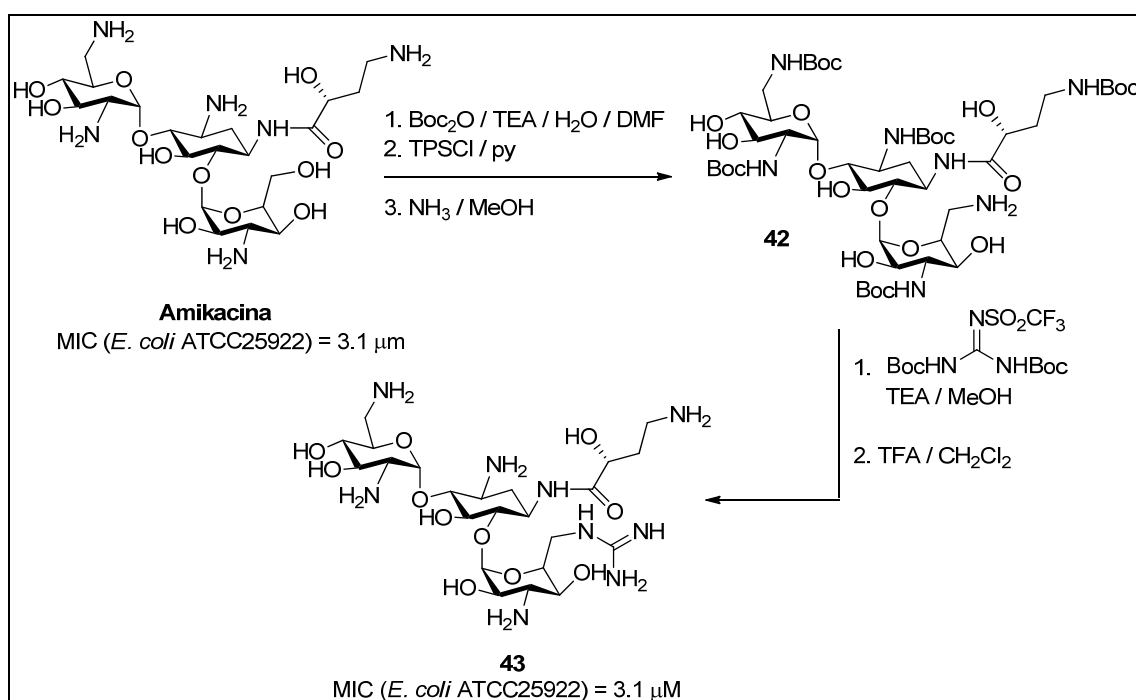
Esquema 3.2. Síntesis de tetra-(γ -guanidino-butírico)-kanamicina A (**41**) y su actividad biológica.



Finalmente, el grupo de Tor y col., en un trabajo aparecido durante la realización de esta Tesis Doctoral, publicó la síntesis de algunos 6''-desoxi-6''-guanidino-

aminoglicósidos y la medida de su actividad antibiótica frente a diversas cepas no resistentes, manteniéndose en muchos de los casos la actividad de los antibióticos naturales.¹⁵⁴ En el esquema 3.3 se muestra, a modo de ejemplo, la preparación del derivado de amikacina y su actividad biológica. Cabe destacar que como primer paso resulta necesaria la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo amino sobre la posición 6'' (42), para finalmente obtener el derivado deseado 43 tras la introducción del guanidinio y posterior desprotección total.

Esquema 3.3. Síntesis de 6''-desoxi-6''-guanidino-amikacina (43) y su actividad biológica.



3.2.2. Objetivos.

En nuestro caso, y a partir de los datos obtenidos por los grupos de Tor y Lapidot en los trabajos anteriormente citados, nos propusimos una hipótesis de trabajo que abordamos en la presente Memoria.

Esta hipótesis considera que los guanidinos presentan debido a sus propiedades químico-físicas por un lado una mayor basicidad que los grupos amino y, además, una mejor capacidad para dar y aceptar enlaces de hidrógeno, hecho fundamental en el

proceso de reconocimiento químico del aminoglicósido tanto con el ARN como con las enzimas de resistencia.

Por este motivo la sustitución total o parcial de los grupos amino de los aminoglicósidos por guanidinos podrían incrementar la carga neta positiva del antibiótico a pH fisiológico y, si esto fuera bien tolerado por el receptor podría posiblemente dar lugar a un incremento en la fuerza de unión al ARNr, viéndose modificada la interacción con las enzimas de resistencia.

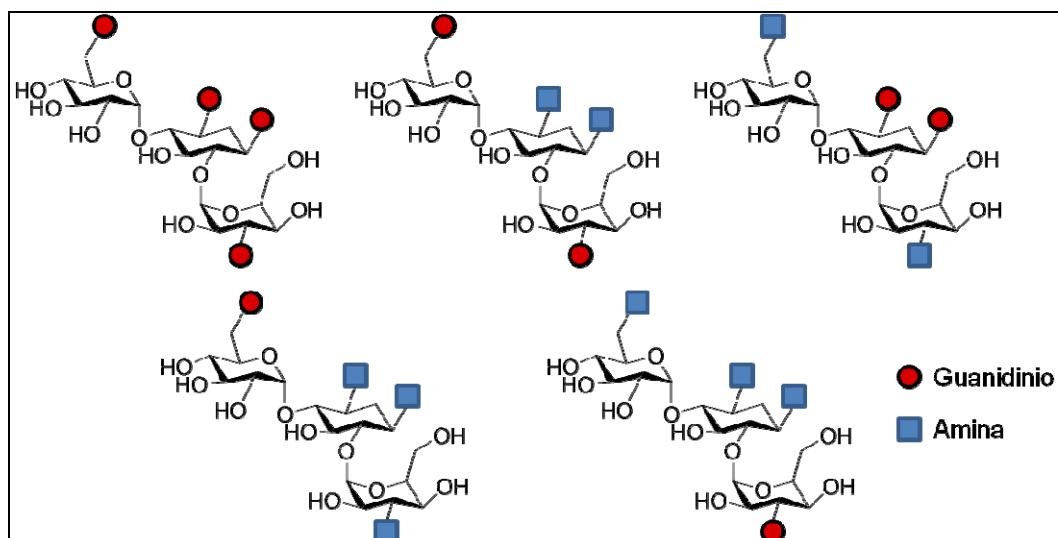
Partiendo de esta hipótesis, en este Capítulo se recoge la síntesis y la actividad biológica de una nueva familia de aminoglicósidos, los guanidino-glicósidos.

3.2.3. Diseño y estrategia sintética.

Como punto de arranque del proyecto, y dada la poca información disponible sobre la influencia que la modificación puntual de los grupos amino tiene sobre estos compuestos, decidimos sintetizar una familia de guanidino-glicósidos de primera generación con el objetivo de realizar un estudio de la relación estructura-actividad. Para ello utilizamos como producto de partida el aminoglicósido natural kanamicina A. Esta elección se debió fundamentalmente a la experiencia de nuestro grupo de trabajo en la modificación química de este compuesto.¹⁵⁵

En la figura 3.5 se muestra de modo esquemático los diferentes guanidino-kanamicina derivados preparados. Estos compuestos combinan en su estructura el aminoglicósido con guanidinos en diferentes posiciones.

Figura 3.5. Estructura de los guanidinio-glicósidos de primera generación



En lo que respecta a la estrategia sintética, excepto para el derivado completamente guanidinilado, el procedimiento elegido para la síntesis de los compuestos objetivo fue la diferenciación de los grupos amino de la molécula de la kanamicina A seguida de la guanidinilación de los aminos libres y posterior desprotección de la molécula. Una vez obtenidos los compuestos mostrados en la figura 3.5 estos se evaluaron como nuevos antibióticos y/o como posibles inhibidores de las enzimas de resistencia, determinando cual es la posición clave a sustituir con objeto de mejorar los antibióticos naturales.

A partir de estos datos una vez finalizado el estudio realizado con kanamicina A se procedió a la extrapolación de los datos a un antibiótico aplicable en la actualidad en clínica.

Una de las tendencias actuales en la preparación de nuevos antibióticos aminoglicósidos, tal como se ha visto en el caso del Plazomicin, es la de modificar antibióticos constituidos por desoxi-azúcares, tales como sisomicina,^{40a} gentamicina¹⁵⁶ o verdamicina,¹⁵⁷ evitando así la inactivación por enzimas tan relevantes como la ANT(4') o la APH(3').

En nuestro caso decidimos emplear la gentamicina comercial, una mezcla de tres compuestos (gentamicina C1, C1a y C2) que poseen una actividad similar.¹⁵⁸ Las razones de nuestra elección fueron tres:

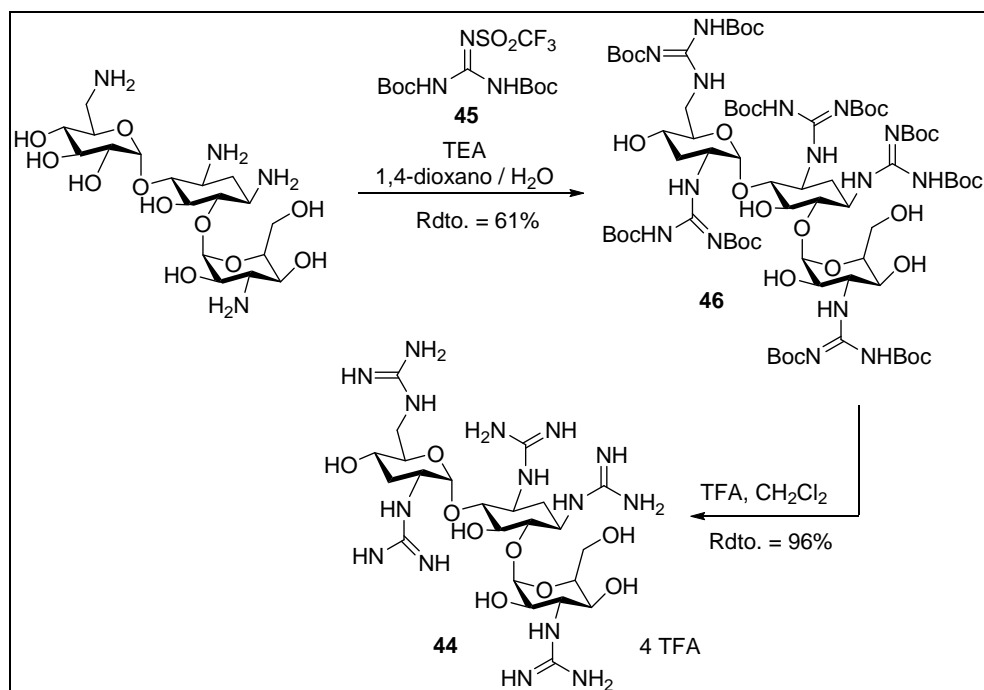
- *Disponibilidad comercial y precio.* La verdamicina no es comercial por lo que fue descartada. En lo que respecta a la gentamicina y la sisomicina hay una gran diferencia de precio ya que 1g. de gentamicina puede adquirirse por 45\$, mientras que el de sisomicina tiene un valor de 250 \$.
- *Utilización en clínica.* Según datos facilitados por el por el Dr. Jerónimo Jaqueti, responsable del laboratorio de análisis del Hospital Universitario de Fuenlabrada, con cuya colaboración se ha realizado esta parte de la Memoria, este antibiótico sigue empleándose en bastantes casos en el ámbito hospitalario para el tratamiento de diversas infecciones, resultando muy interesante la preparación de nuevos derivados.
- *Toxicidad.* Muy recientemente se ha demostrado que el derivado de gentamicina C₂ presenta una nefrotoxicidad muy reducida, que podría disminuirse por la introducción de uno o varios grupos guanidinio en lugar de los aminos.^{138b}

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Síntesis de los guanidino-glicósidos derivados de kanamicina A.

La obtención del derivado **44** se encuentra representada en el esquema 3.4. y se llevó a cabo según el procedimiento descrito en la bibliografía por el grupo de Tor y col.^{152a} en una secuencia de sintética de dos pasos.

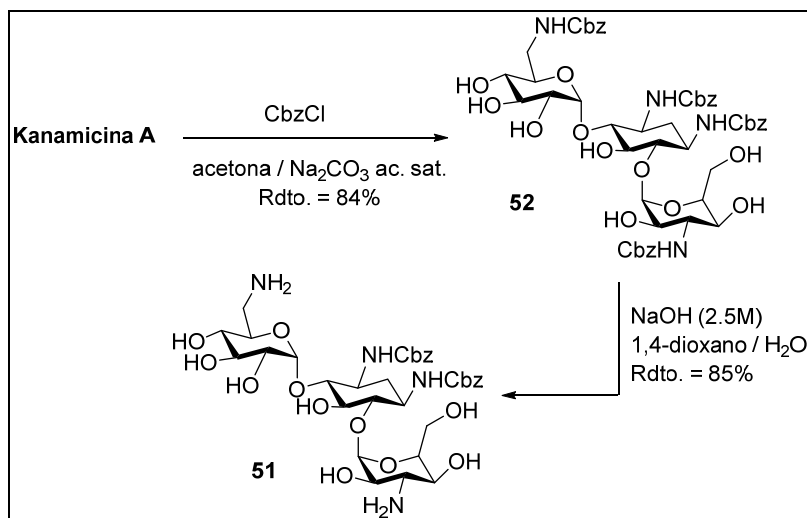
En un primer paso se introdujeron los grupos guanidinio sobre la kanamicina A utilizando N,N'-(Boc)₂-N''-trifilguanidinio (GN-Tf, **45**) como reactivo guanidinilante, en una mezcla de 1,4-dioxano y agua, obteniendo el derivado **46**. Finalmente, la desprotección en medio ácido de los grupos *terc*-butoxicarbonilos, proporcionó el compuesto **44** en forma de sal de trifluoroacetato con un rendimiento total del 58% (2 pasos).

Esquema 3.4. Síntesis de 1,3,6',3''-tetra-guanidino-kanamicina A 44

Para la síntesis de los derivados guanidinilados puntualmente (**47-50**) fue necesaria la protección regioselectiva de algunos grupos amino. Entre los métodos más comúnmente empleados para este fin se encuentran la quelación con metales que actúan como “grupos protectores temporales”,^{95, 125b, 128c, 159} la reducción selectiva de azidas mediante una reacción de Staudinger,^{96, 132, 160} y la secuencia protección/desprotección de carbamatos en medio básico a través de la formación de uretanos.^{117i, 161} En lo que respecta a la protección regioselectiva de los aminos primarios la utilización de carbamatos voluminosos ha dado buenos resultados.¹⁶²

En nuestro caso se han seguido dos metodologías distintas, dependiendo de la/s posición/es a modificar: la protección/desprotección de carbamatos en medio básico y la utilización de los mismos como reactivos voluminosos.

Para la obtención de los derivados 1,3- y 6',3''-di-guanidinilados de kanamicina A (**47** y **48**) la estrategia más directa implica la síntesis del compuesto 6',3''-(Cbz)₂-kanamicina A (**51**) en una secuencia sintética en dos pasos (esquema 3.5) y su posterior modificación.

Esquema 3.5. Síntesis de la 6',3''-(Cbz)₂-kanamicina A (51**)**

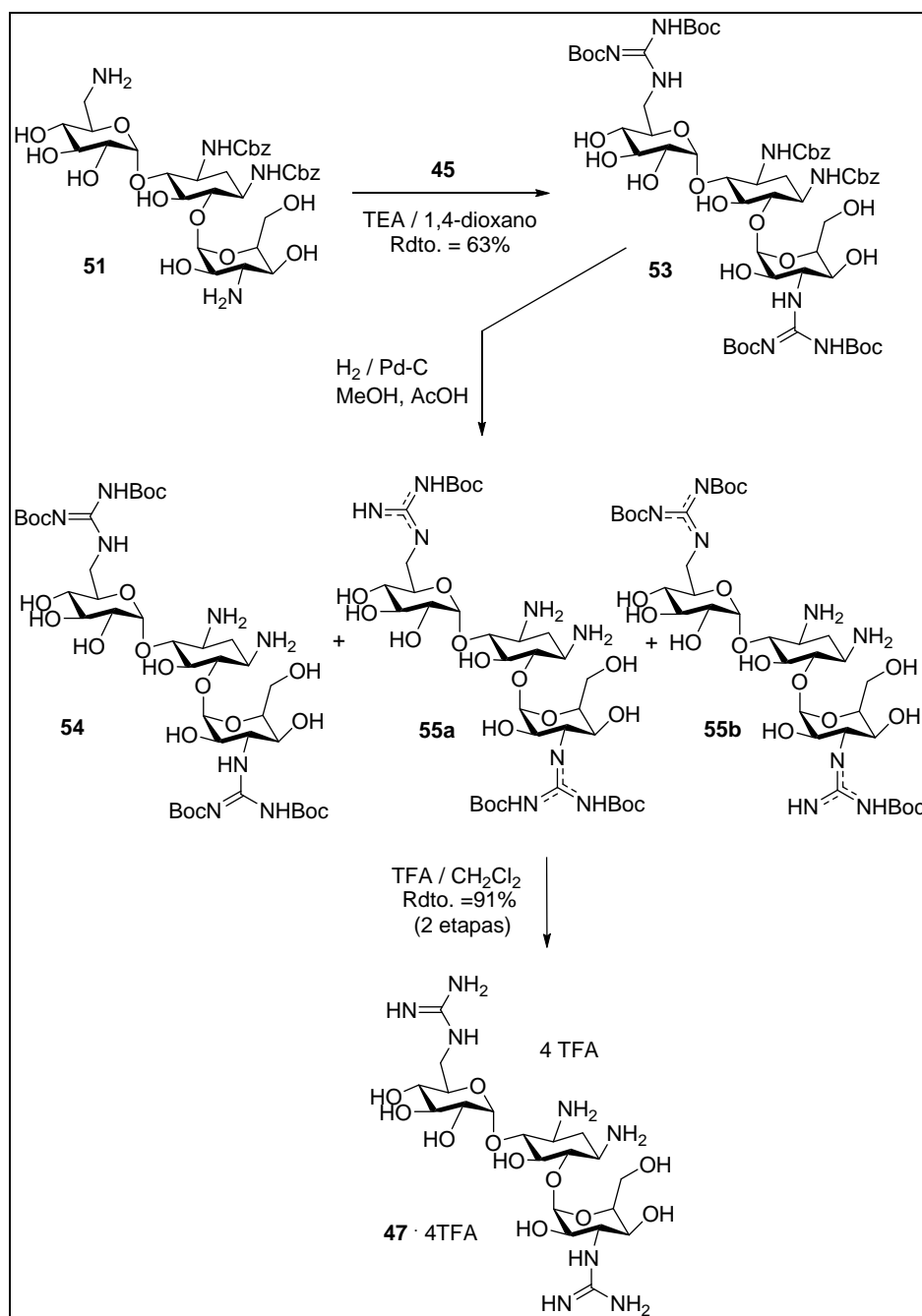
El primer paso fue la protección total de los grupos amino como benciloxicarbonilos según el procedimiento descrito por el grupo de Li y col. en el año 2008.^{161f} El tratamiento del sulfato de kanamicina A con cloruro de benciloxicarbonilo en una mezcla de acetona y una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃ daba lugar a la formación de un sólido blanco constituido por el producto final **52** y Na₂CO₃ fácilmente separables mediante un ajuste adecuado del pH. Sin embargo, en nuestro caso el procedimiento experimental se complicó considerablemente debido a que el sólido se encontraba hidratado, lo que dificultaba considerablemente el aislamiento y purificación del producto deseado. Teniendo en cuenta la experiencia previa de nuestro grupo de trabajo atribuimos este hecho a la presencia de sales de tipo sulfato provenientes del producto de partida. Para evitar este inconveniente decidimos emplear la kanamicina A en forma de base libre, obtenida mediante neutralización con una resina Amberlita® 400 (HO⁻), como producto de partida. El segundo paso fue la desprotección de los grupos aminos de las posiciones 6' y 3'' mediante eliminación regioselectiva en medio básico de los grupos benciloxicarbonilos. Para ello, y según las condiciones descritas por el grupo de Li y col.¹¹⁷ⁱ el compuesto **52** fue tratado con una solución acuosa de NaOH (2.5 M) en una mezcla de 1,4-dioxano y H₂O a 50 °C obteniéndose así el compuesto **51** con un rendimiento global del 71% (dos etapas).

Una vez sintetizado este intermedio la obtención de **47** se llevó a cabo según el procedimiento mostrado en el esquema 3.6. El tratamiento del derivado **51** con el agente guanidinilante **45**, TEA como base y 1,4-dioxano como disolvente dio lugar al

compuesto **53**, el cual fue desprotegido posteriormente en dos etapas. En la primera de ellas se eliminaron los grupos benciloxycarbonilos mediante hidrogenación catalítica, en MeOH a temperatura ambiente y en presencia de Pd-C.

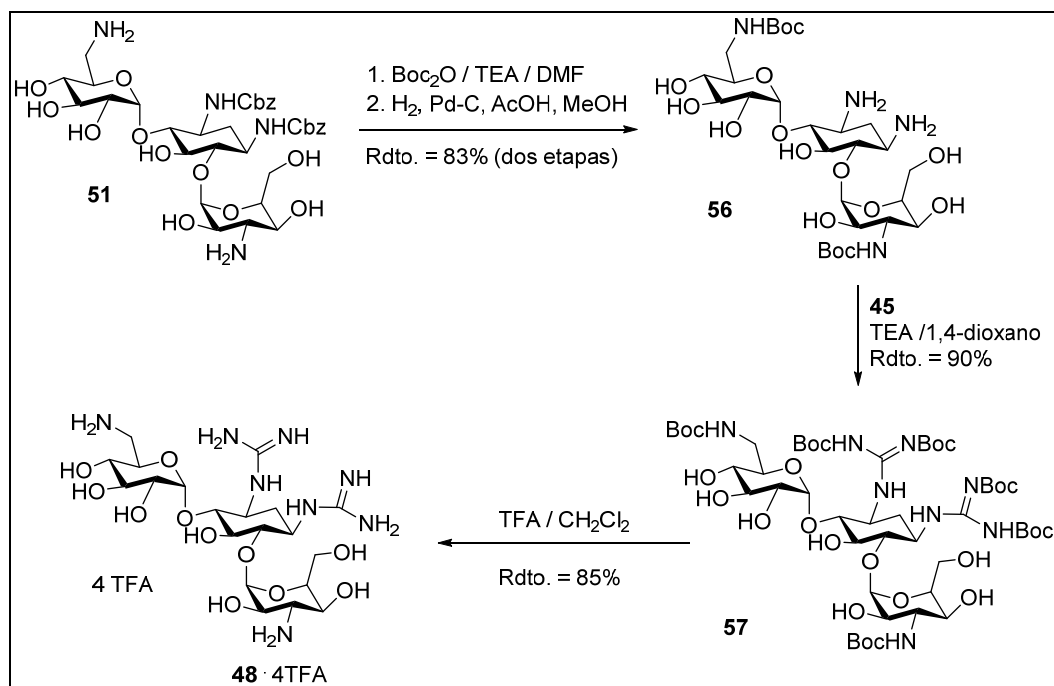
La purificación de este compuesto mediante cromatografía en columna, llevó a la obtención de un sólido blanco, aparentemente puro por TLC (CHCl₃/MeOH/NH₄OH, 8:2:0.2). Sin embargo, cuando se registraron sus espectros de ¹H-RMN y de ¹³C-RMN, se observó la presencia de una mezcla de varios compuestos derivados de kanamicina A y con guanidinos en su estructura. Dicha mezcla presentaba dos picos moleculares en su espectro de masas (Electrospray, modo positivo) a m/z 969 (M+1)⁺ y 869 (M+1)⁺, lo que permitió la identificación de la mezcla como el derivado **54** y una combinación de los productos provenientes de la desprotección de uno de los grupos *terc*-butoxicarbonilos (**55a** y **55b**). La posterior desprotección del resto de carbamatos mediante el tratamiento con TFA en CH₂Cl₂ condujo al producto **47** en forma de sal con un rendimiento del 57% a partir de **51** (tres etapas).

La síntesis del compuesto 1,3-di-guanidinio-kanamicina A **48** (esquema 3.7) se llevó a cabo utilizando como producto de partida el derivado **51** tal como se muestra en el esquema 3.7.

Esquema 3.6. Síntesis del compuesto 6',3''-di-guanidinio-kanamicina A **47**

El tratamiento de **51** con di-*terc*-butil-dicarbonato y TEA en DMF anhidra, seguida de una hidrogenación catalítica en presencia de Pd-C en MeOH dio lugar al intermedio **56**. La guanidinilación de éste en idénticas condiciones a las utilizadas anteriormente proporcionó el derivado **57**, que fue desprotegido empleando TFA en CH_2Cl_2 . De esta manera se obtuvo la sal del compuesto **48** con un rendimiento global del 63% a partir de **51** (4 etapas).

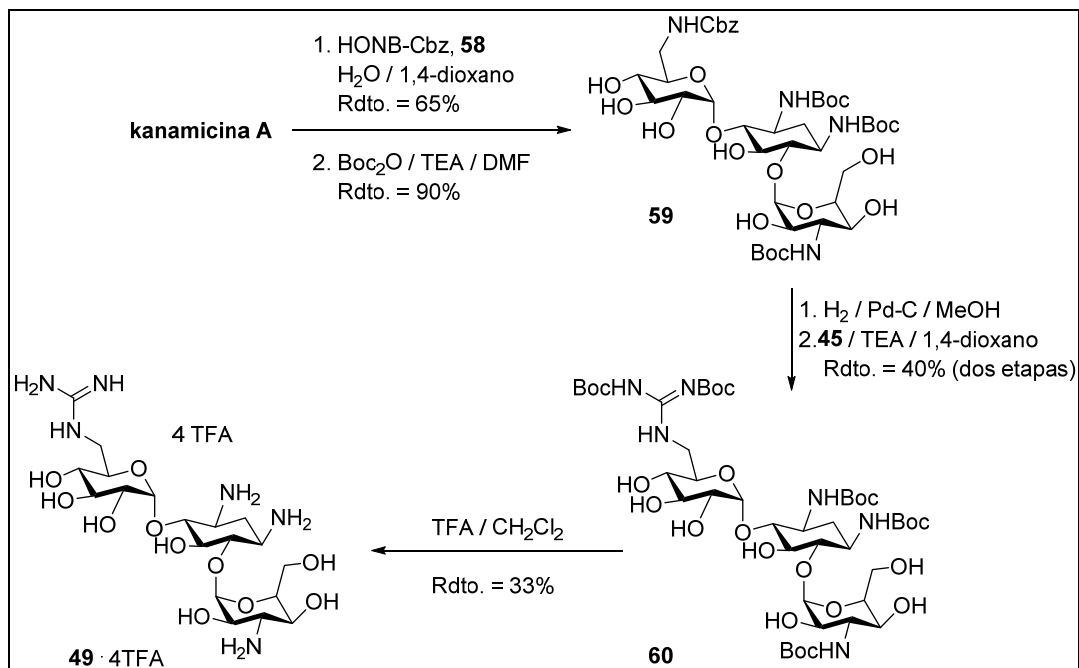
Esquema 3.7. Síntesis del compuesto 1,3-di-guanidinio-kanamicina A **48**



Para la preparación del 6'-guanidinio-kanamicina A **49**, el procedimiento de síntesis elegido inicialmente se muestra en el esquema 3.8.

En primer lugar se llevó a cabo la protección regioselectiva del amino 6' como benciloxicarbonilo empleando el procedimiento descrito por Auclair y col.¹⁶³ El tratamiento del sulfato de kanamicina A con N-Cbz-5-norborneno-endo-2,3-dicarboximida (HONB-Cbz, **58**) en una mezcla de H_2O y 1,4-dioxano permitió la protección regioselectiva de la posición 6'. En una etapa posterior el resto de los aminos fueron protegidos por reacción con di-*tert*-butil-dicarbonato y TEA en DMF anhidra, obteniendo el intermedio **59**. La posterior hidrogenólisis de éste con Pd-C en MeOH y guanidinilación empleando las condiciones descritas previamente dieron lugar al compuesto **60**, el cual fue desprotegido mediante tratamiento con TFA en CH_2Cl_2 . Se obtuvo así la sal de TFA de **49** con un rendimiento global del 7.7% (5 etapas).

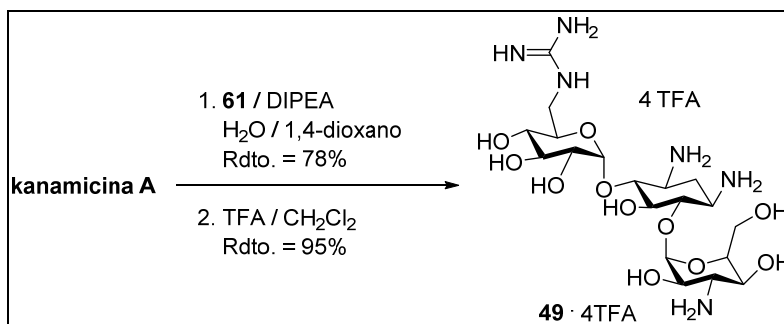
Esquema 3.8. Síntesis del compuesto 6'-guanidinio-kanamicina A **49 (primera aproximación)**



Debido al bajo rendimiento de la ruta propuesta y a la dificultad que suponía el obtener los intermedios con la pureza necesaria decidimos diseñar una estrategia de síntesis alternativa, que perseguía la guanidinilación de forma regioselectiva en la posición 6' de la kanamicina A, no haciendo necesario el uso de grupos protectores. Para ello se optó por utilizar el agente guanidinilante N-N'- (Boc)₂-1*H*-pirazol-1-carboxamida (GN-Pir, **61**) ya que además de ser comercial había sido empleado anteriormente para la guanidinilación de aminos primarios frente a secundarios.¹⁶⁴

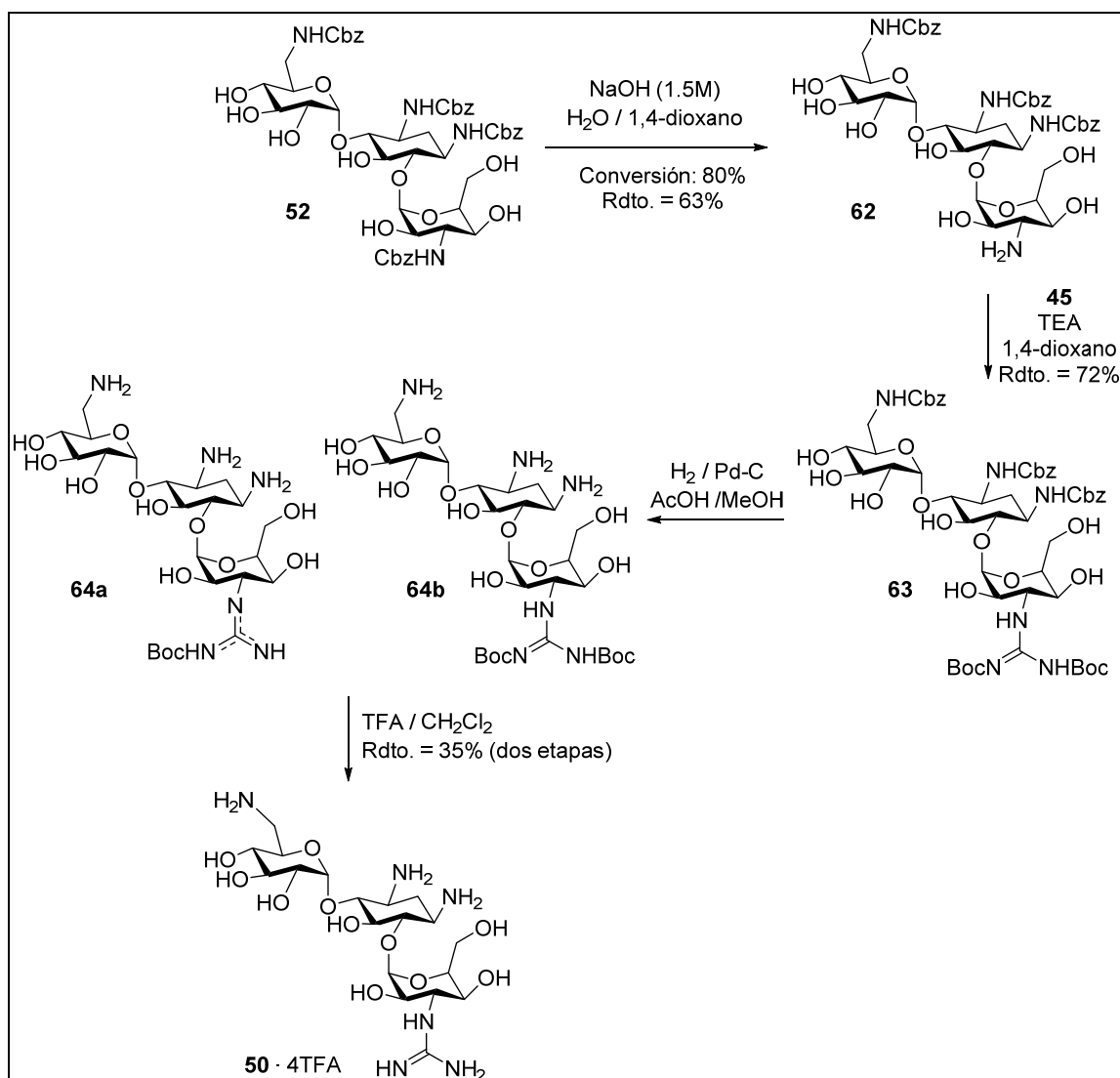
Así, según se representa en el esquema 3.9, la reacción de kanamicina A con **61**, DIPEA en una mezcla de H₂O y 1,4-dioxano y posterior desprotección en medio ácido permitió la obtención del compuesto **49** con un rendimiento global del 74% en sólo 2 etapas a partir de la kanamicina A.

Esquema 3.9. Síntesis del compuesto 6'-guanidinio-kanamicina A **49** (segunda aproximación)



Finalmente para la obtención del derivado **50** utilizamos una estrategia muy similar a la descrita para la preparación del compuesto **47** que se muestra en el esquema 3.10.

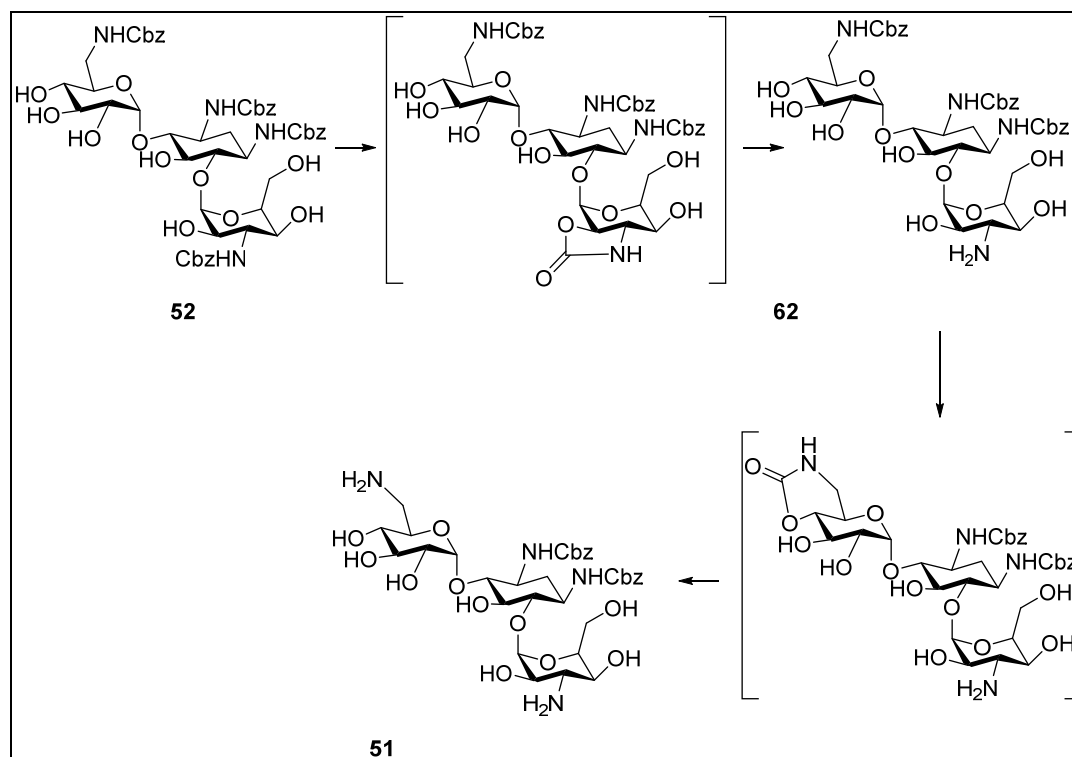
Para ello, y según las condiciones descritas por el grupo de Li y col.¹¹⁷ⁱ el compuesto **52** fue tratado con una solución acuosa de NaOH (1.5 M) en una mezcla de 1,4-dioxano y H_2O a temperatura ambiente durante 8 h con el objetivo de preparar el intermedio **62**. Sin embargo, a partir de los espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y del espectro de masas del compuesto obtenido se dedujo que se habían desprotegido tanto la posición 3'' como la 6' (compuesto **51**).

Esquema 3.10. Síntesis del compuesto 3''-guanidinio-kanamicina A **50**

El resultado obtenido puede explicarse a partir del mecanismo de la reacción descrito en la bibliografía y que se muestra en el esquema 3.11.^{161f} De acuerdo con éste, la desprotección de los aminos de las posiciones 3'' y 6' (compuesto **51**) tiene lugar en dos etapas, ocurriendo inicialmente sobre la posición 3'' (compuesto **62**) y en una segunda etapa sobre 6'.

Esto indica que la obtención del compuesto tri- o di- protegido (**62** ó **51**) depende fundamentalmente de las condiciones de reacción, en particular de la temperatura y de la concentración de base empleada, siendo posible la optimización de la misma.

Esquema 3.11 Mecanismo de la reacción de desprotección.



En nuestro caso los mejores resultados, tal como se muestra en el esquema 3.10, se obtuvieron mediante el tratamiento de **52** con una disolución de NaOH (1.5M) a una temperatura de 4 °C, ya que aunque la reacción no tuvo una conversión superior al 80%, no se observó la formación del compuesto di-protegido **51**.

Una vez sintetizado el derivado **62** se procedió a su guanidinilación, empleando para ello **45** como agente guanidinilante y TEA en 1,4-dioxano, según las condiciones ya descritas anteriormente en esta Memoria, lo que dio lugar al intermedio **63**.

Cuando se llevó a cabo la desprotección de los grupos benciloxicarbonilos mediante hidrogenación, y tal como ya ocurría en la síntesis de **47**, se obtuvo una mezcla de compuestos (**64a** y **64b**) cuyo espectro de masas (Electrospray, modo positivo) presentaba dos picos moleculares a m/z 729 ($M+1$)⁺ y 626 ($M+1$)⁺ que indicaban la desprotección de uno de los grupos *terc*-butoxicarbonilo. La posterior desprotección del resto de grupos mediante el tratamiento con TFA en CH₂Cl₂ condujo al producto **50** en forma de sal con un rendimiento del 15% a partir de **52** (cuatro etapas).

La estructura de todos los compuestos sintetizados fue confirmada mediante las técnicas analíticas y espectroscópicas habituales. En el caso de los intermedios cuyos grupos amino se encuentran protegidos como carbamatos parcialmente para la determinación de su estructura, además de compararlos con los descritos previamente en la bibliografía llevamos a cabo su acetilación, con objeto de determinar el número de aminos libres presentes en la molécula. En el caso de los derivados finales cabe destacar la aparición en sus espectros de ^1H -RMN de las señales de los NH del guanidinio en el rango de 8-7 ppm si el espectro se registra en DMSO- d_6 y en los de ^{13}C -RMN de las señales correspondientes al guanidinio en el rango de 160.0-150.0 ppm.

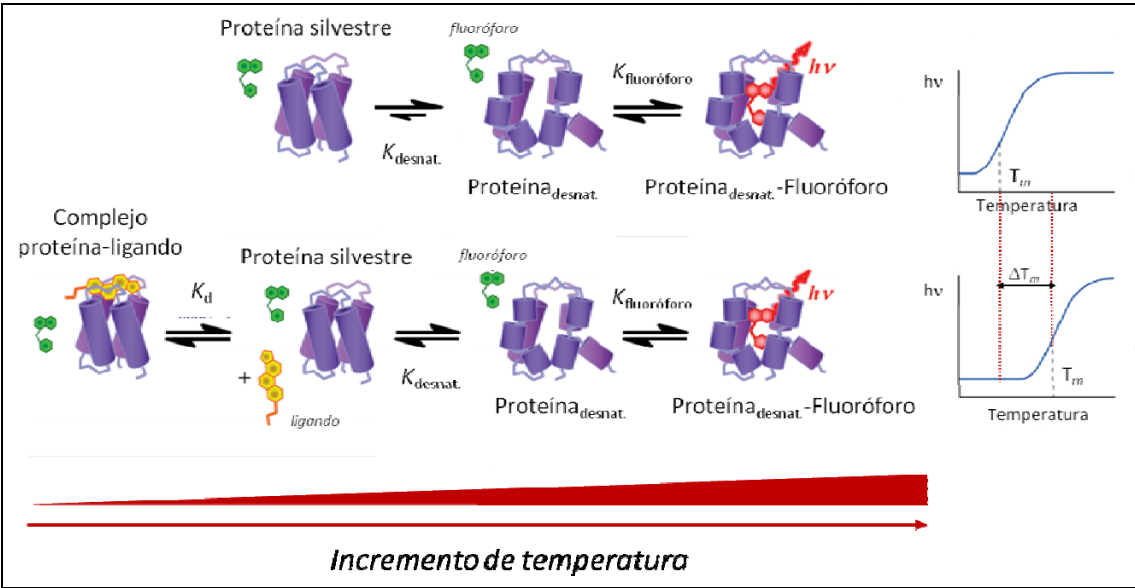
3.3.2. Estudios “*in vitro*” de los guanidinio-glicósidos **44** y **47-50** con enzimas modificadoras de aminoglicósidos

Los guanidino-glicósidos **47-50** sintetizados en el apartado anterior fueron evaluados como ligandos de las enzimas de resistencia a aminoglicósidos. En particular, fueron elegidas tres enzimas, cada una de ellas perteneciente a una familia distinta: la ANT(4') de *S.aureus* de las *N*-nucleotidil-transferasas, APH(3')-IIa de *E.coli* de las *O*-fosfotransferasas y AAC(6') de *S.aureus* de las *N*-acetil-transferasas, las cuales fueron clonadas y expresadas en *E. coli* en nuestro laboratorio y posteriormente purificadas por intercambio iónico.

Este estudio fue llevado a cabo a través de un método puesto a punto durante la últimos años para el cribado de compuestos, cuyo fundamento teórico se basa en que, tal como se muestra en la Figura 3.6, la unión del ligando a la proteína objetivo estabiliza el estado nativo de la misma incrementado su temperatura de desnaturalización.¹⁶⁵

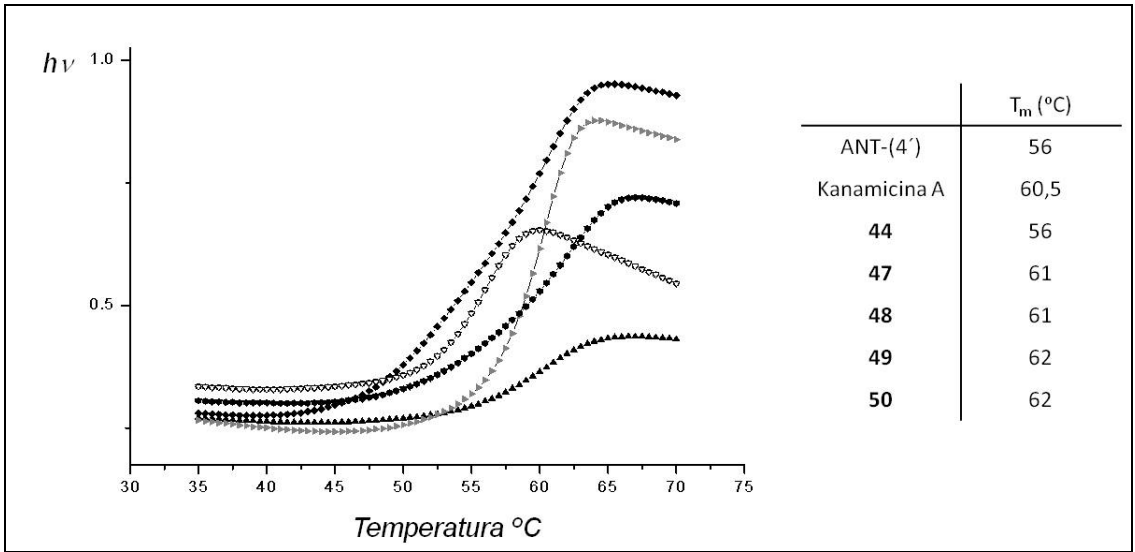
De este modo la medida de la variación en la temperatura de transición de desnaturalización de la proteína (ΔT_m), punto medio de la curva, en presencia de los ligandos en relación a la obtenida a partir de la proteína en ausencia de los mismos permite conocer que compuestos son ligandos de la proteína empleada.

Figura 3.6.- Cribado de compuestos mediante la medida de ΔT_m



A modo de ejemplo en la figura 3.7 se muestran las curvas de desnaturalización de la *O*-nucleotidiltransferasa ANT(4') tanto en estado libre como en estado asociado al antibiótico natural y a los guanidinio-glicósidos 47-50.

Figura 3.7.- Curva de desnaturalización del enzima ANT(4') (5 μ M) (\circ) libre y en presencia de los ligandos guanidinio-glicósidos (10 mM) (44 Δ , 47 \blacklozenge , 48 \blacktriangleright , 49 \blacktriangledown y 50 \blacksquare) y su sustrato natural la kanamicina A (\blacktriangle).



Los resultados obtenidos para la medida de T_m s con las diferentes enzimas se encuentran recogidos en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores de T_m de la ANT(4') de *S. aureus*, APH(3')-Iia de *E. coli* y AAC(6')-Ib de *S. aureus* libre y en presencia de kanamicina A y de los guanidinio-glicósidos (**44**, **47-50**).

<i>Ligandos</i>							
<i>Enzima</i>	Blanco	Kan-A	44	47	48	49	50
ANT(4')	56±0,1	60,5±0,1	56±0,02	61±0,04	61±0,12	62±0,1	62±0,07
APH(3')-Iia	49±0,1	62±0,12	49±0,03	50±0,03	51±0,02	57±0,1	55,5±0,2
AAC(6')-Ib	42±0,2	46±0,15	42±0,12	43±0,2	42±0,2	42±0,2	47±0,15

Como compuesto de referencia se empleó la kanamicina A, que dio lugar a una estabilización térmica en todos los casos con un ΔT_m de 4 °C para la ANT(4') y la AAC(6')-Ib y de 14 °C para la APH(3')-Iia. En lo que respecta a los guanidinio-glicósidos sintéticos el compuesto **44** no resultó ser ligando de ninguna de las tres enzimas ya que no presentó ningún desplazamiento de la T_m , lo que puede deberse a su gran tamaño.

Para el resto de derivados (**47-50**), se observó una clara estabilización térmica de las enzimas *N*-nucleotidiltransferasa ANT(4') y *O*-fosfotransferasa APH-(3'). En el caso de la ANT(4') se observaron ΔT_m s de entre 4 y 6 °C y en el de la APH(3')-Iia de entre 1 y 3 °C. Sin embargo, en el caso de la *N*-acetiltransferasa ACC(6')-Ib únicamente se observó ΔT_m para el derivado **50** (Tabla 3.1).

A partir de estos datos se puede afirmar que los compuestos **47-50** son ligandos de las enzimas estudiadas, pudiendo ser sustratos o inhibidores de las mismas.

Con objeto de determinar de qué tipo de ligandos se trataba llevamos a cabo medidas de velocidades de las reacciones enzimáticas de la kanamicina A y de los compuestos **47-50** en presencia de ATP (para el caso de las ANT(4') y la APH(3')) o con Acetil-CoA (para el caso de la AAC(6')). En la tabla 3.2 se muestran los valores de velocidades relativas para la reacción de **47-50** en relación a los del ligando natural kanamicina A ($V_{rel} = 100\%$).

Tabla 3.2. Velocidad de reacción relativa (V_{rel} [%]) de los enzimas ANT(4'), APH(3')-Iia y AAC(6')-Ib con kanamicina A y **47-50**.

Ligandos	ANT(4')	APH(3')-Iia	AAC(6')- Ib
Kan-A	100	100	100
47	25	n.r	30
48	11	40	n.r
49	66	67	n.r
50	50	80	40

Como conclusión general del estudio puede afirmarse que la presencia de 1 ó 2 grupos guanidinio sobre la kanamicina A da lugar a una disminución en la velocidad de reacción inicial en comparación a la del sustrato natural. Sin embargo, esta modificación estructural aunque resulta relevante en la actividad enzimática no es suficiente para prevenir la inactivación de dichos derivados.

Más concretamente, en el caso del enzima ANT(4') todos los guanidino-glicósidos ensayados **47-50** fueron sustratos del enzima, resultados indicativos de la gran promiscuidad de este enzima, un hecho ya demostrado previamente en nuestro grupo de investigación¹⁶⁶. En el caso de la APH(3')-Iia fueron sustratos del enzima todos los compuestos ensayados, a excepción del derivado **48** que presenta dos grupos guanidinos sobre el anillo de 2-DOS, indicando una ligera disminución de la promiscuidad enzimática.

El hecho de que los compuestos **47** y **49** sean sustratos de ambas enzimas modificadoras resulta sorprendente dado que en ambos casos el grupo guanidinio se encuentra en la posición 6' del anillo I del antibiótico (azúcar objetivo de ambas enzimas) y en una posición muy cercana a las modificadas (4' y 3' respectivamente). Sin embargo, estos resultados no resultan más que una nueva prueba de la remarcable

baja sensibilidad que presentan este tipo de enzimas hacia su sustrato natural la kanamicina A, representando de nuevo un ejemplo de promiscuidad.

Por último, para el caso de la AAC(6') tal y como esperábamos, los compuestos **47** y **49** no fueron sustratos de dicha enzima. Estos compuestos tienen un grupo guanidinio en la posición 6' y fueron los únicos derivados que presentaron actividad inhibitoria competitiva frente al enzima ACC-6'-Ib, con una CI_{50} de 0.6 y 1 mM, respectivamente. Esto podría ser debido a que el residuo catalítico básico de este enzima es incapaz de abstraer un protón del ácido conjugado del grupo guanidinio primario, lo que hace que no pueda actuar como nucleófilo frente a la acetil-CoA. Este resultado indica que la enzima es incapaz de transferir un grupo acilo a un grupo funcional más básico que el grupo amino, o que abre un camino en el diseño de nuevos inhibidores más potentes y selectivos para la familia de las enzimas *N*-acetil-transferasas, una de las más relevantes en el ámbito clínico.

3.3.3. Actividades “*in vivo*” con cepas resistentes y no resistentes a enzimas modificadoras de los guanidino-glicósidos **44 y **47-50**.**

Los guanidinio-glicósidos **44** y **47-50** preparados pueden considerarse híbridos de estreptomicina y kanamicina A ya que, a pesar de que presentan la estructura del antibiótico natural kanamicina A, sin embargo, contienen uno o varios grupos guanidinio característicos de la estreptomicina. Por este motivo los nuevos compuestos podrían presentar una combinación de las propiedades biológicas que presentan las moléculas de partida, manteniendo la actividad antibiótica y reduciendo su resistencia, hecho este último que puede ser razonable si se tienen en cuenta los resultados descritos “*in vitro*” en el apartado 3.3.2, mejorando así su perfil biológico.

Con objeto de confirmar dichas hipótesis se llevaron a cabo experimentos de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) frente a una amplia variedad de cepas bacterianas resistentes y no resistentes a las enzimas modificadoras de aminoglicósidos disponibles en nuestro laboratorio, así como a cepas hospitalarias procedentes de pacientes del Hospital de Fuenlabrada de Madrid. Los resultados se recogen en la tabla 3.3. Como compuesto de referencia empleamos la kanamicina A un poderoso antibiótico natural de amplio espectro, con una CIM de 2 µg/mL para la cepa Gram-(+) *B. circulans* y de 6 µg/mL para la Gram-(−) *E. coli*. Sin embargo, cuando las enzimas

ANT(4'), APH(3')-Iia o AAC(6')-Ib fueron expresadas en las correspondientes cepas a tratar, la kanamicina A pierde completamente su actividad antibiótica (MIC>200 µg/mL).

Tabla 3.3. Concentración Inhibitoria Mínima de kanamicina A y de los guanidinio-aminoglicósidos **44** y **47-50** frente a cepas bacterianas resistentes y no a enzimas modificadoras de aminoglicósidos.

Cepas	CIM (µg/mL)					
	Compuestos					
	Kan-A	44	47	48	49	50
<i>E. coli</i> /ATCC 25922	4	>139	>100	>138	50	4
<i>E. coli</i> BL21	6	>100	>100	>100	25	15
<i>E. faecalis</i> / ATCC 29212	16	>100	>100	>100	>100	50
<i>S. gallolyticus</i> / ATCC 49147	16	nd	nd	>138	nd	>18
<i>B. circulans</i> / CECT 10	2	>100	>100	50	50	5
<i>P. eruginosa</i> /ATCC 15692	25	>139	>100	>100	>100	50
<i>S. aureus</i> /ATCC 29213	4	>139	>150	>138	nd	2
<i>D. radiodurans</i> /ATCC	<25	nd	nd	nd	nd	<50
MRSA - ATCC 1228	>100	>100	>100	>100	>100	>50
MRSA – ATCC 33591	20	>100	>100	>100	>100	10
<i>E. coli</i> DH5α (APH(3')-Iia)	>200	>50	>50	>50	>100	75
<i>E. coli</i> DH5α (ANT(4'))	>200	>200	>200	>200	>100	50
<i>E. coli</i> BL21(AAC(6')-Ib)	>200	>100	>100	>100	>75	50
<i>E. coli</i> /2501	24	nd	nd	nd	nd	2
<i>K. pneumonia</i> /2556	2	nd	>150	>138	nd	2
<i>E.coli</i> /2323	24	nd	nd	nd	nd	2

S.aureus /2638

2

nd

nd

nd

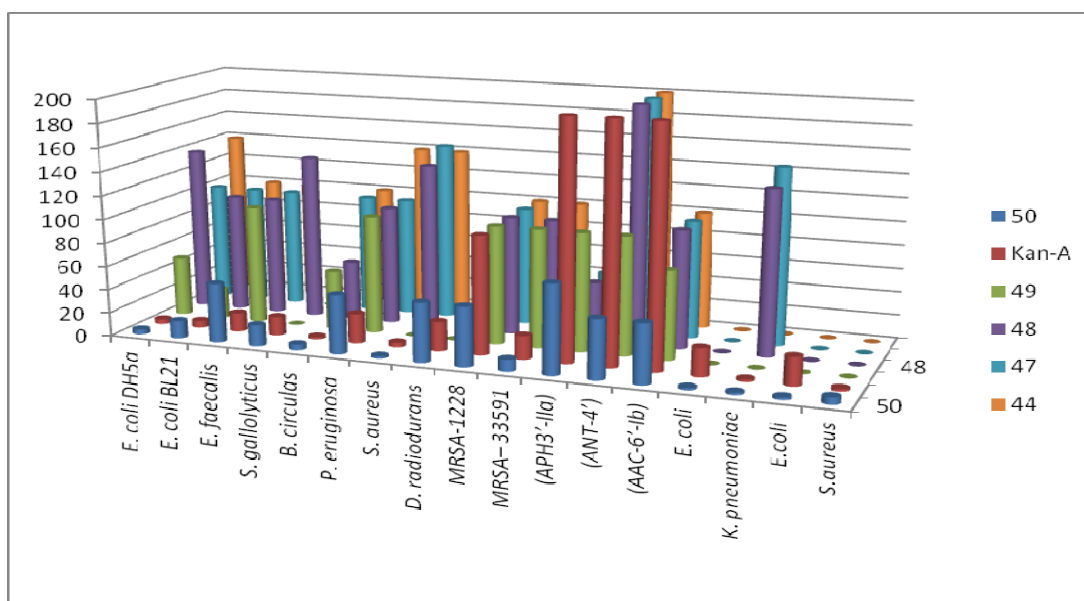
nd

6

nd: Valor no determinado

De una forma más gráfica los valores de CIM's se encuentran representados en la figura 3.8.

Figura 3.8. Representación gráfica de los valores de CIM recogidos en la tabla 3.3.



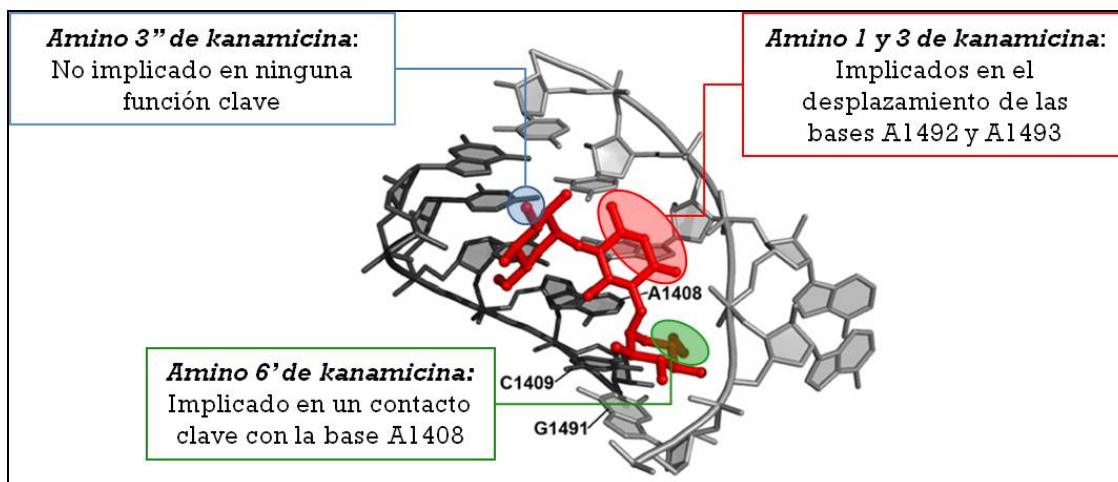
En el caso de los derivados guanidinilados, la presencia de más de un grupo guanidinio en el esqueleto de la kanamicina A, tal como es el caso de los compuestos **44**, **47** y **48** dio lugar a una muy pobre actividad antibiótica tanto en ausencia como en presencia de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos (MIC >200 µg/mL).

Por otro lado, el compuesto **49**, donde el amino primario de la posición 6' ha sido regioselectivamente convertido en un grupo guanidinio, presenta una moderada actividad antibiótica (MIC= 50 µg/mL) frente a cepas Gram-(+) y Gram-(−) no resistentes, perdiendo esta actividad en cepas que contienen las enzimas modificadoras.

Esta pérdida de actividad antibiótica, podría ser explicada atendiendo a la estructura cristalográfica entre el ARNr 16S y la kanamicina A (figura 3.9). Así los aminos de las posiciones 1 y 3 del anillo de 2-DOS resultan fundamentales para llevar a cabo el desplazamiento de las A1492 y A1493, paso clave en el mecanismo de acción de los antibióticos aminoglicósidos derivados de 2-DOS. Por otro lado, el amino de la posición 6' está implicado en contactos claves con la A1408 del sitio-A del ARNr y su

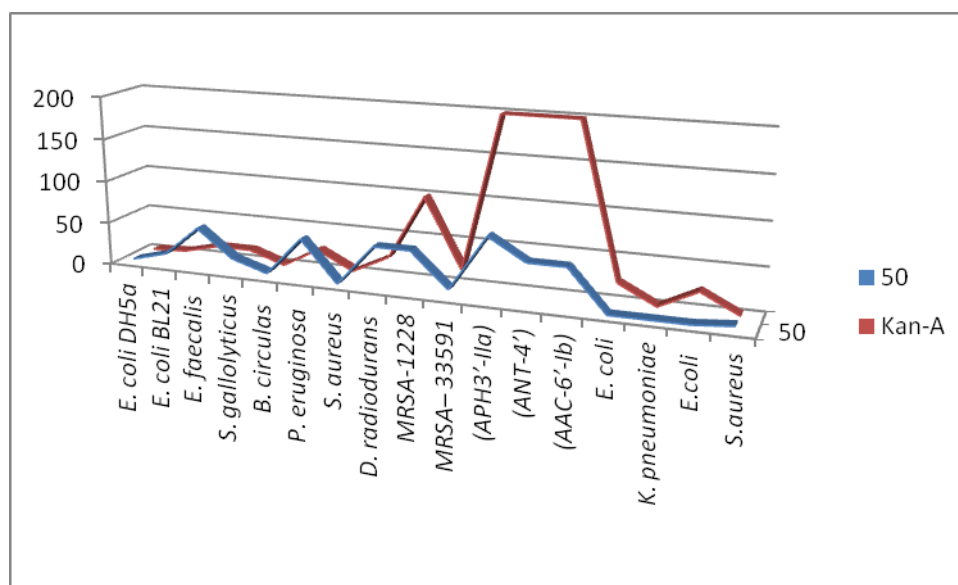
eliminación impide la unión correcta del aminoglicósido al sitio A en el caso de la kanamicina A.^{152b, 154, 167}

Figura 3.9.- Función de los aminos de las posiciones 1,3 y 6' de kanamicina A en el complejo con el sitio A.



Finalmente, en lo que respecta al derivado mono-guanidinilado regioselectivamente en la posición 3'' de kanamicina A (**50**) se observa una actividad antibiótica considerable frente a cepas Gram-(+) como Gram-(-) y también con cepas hospitalarias con diferentes fenotipos de resistencia. Estos datos indican que una modificación de la posición 3'' puede ser tolerada por el receptor sin una importante pérdida de actividad. A esto hay que añadir, tal como se refleja en la figura 3.10 que la mono-guanidiniliación de esta posición resulta muy satisfactoria en el caso de las cepas que contienen las enzimas de resistencia, ya que se recupera en parte la actividad antibiótica.

Este resultado puede explicarse también en función de la estructura cristalográfica de la figura 3.9.^{65b} En ella puede verse como el amino de la posición 3'' de la kanamicina A no presenta una función clave, excepto la de aportar una carga positiva. Por este motivo la introducción de un grupo guanidinio no afectaría a la actividad bactericida, ya que no sólo mantiene la carga positiva, sino que la aumenta, ya que este grupo funcional presenta dos cargas positivas.

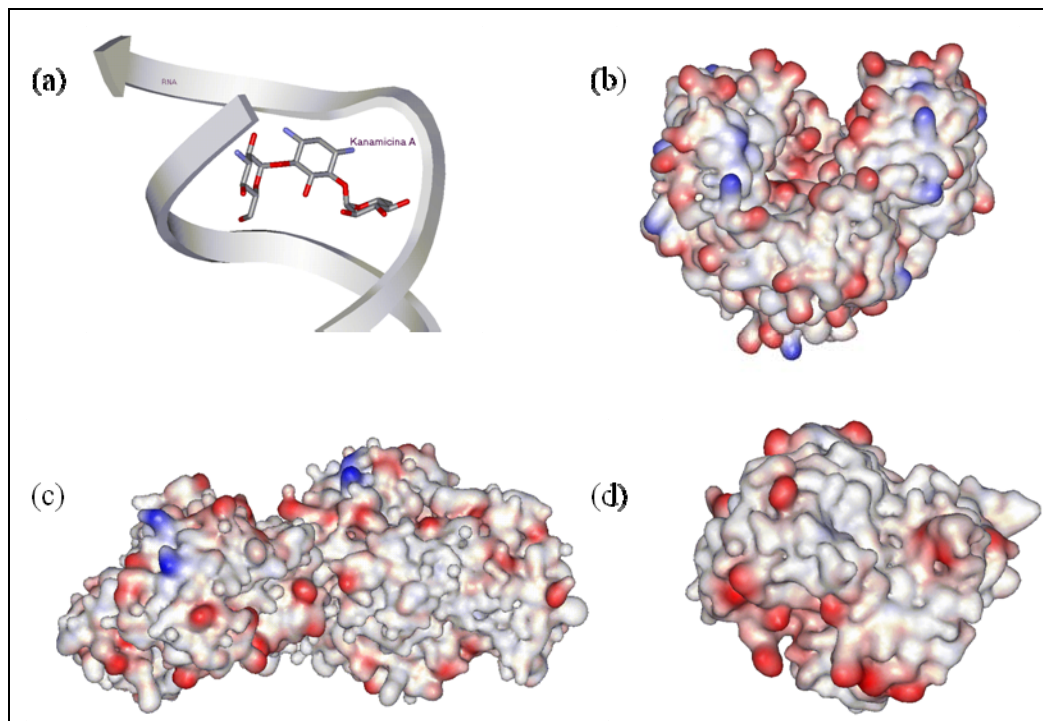
Figura 3.10. Representación de las CIM's de la kanamicina A y del compuesto **50**.

3.3.4. Estudios *in silico* de interacciones ligando-receptor.

A la vista de los resultados obtenidos la determinación de las interacciones más probables entre los guanidino-glicósidos sintetizados (fundamentalmente el derivado **50**) con las enzimas de resistencia y el ARNr puede resultar de gran utilidad para llevar a cabo el diseño de nuevos aminoglicósidos que sean menos susceptibles a la inactivación enzimática. Para ello decidimos realizar un estudio computacional empleando *docking* molecular empleando Glide de Schrödinger-Maestro v9.2.7.¹⁶⁸

Tal como se ha explicado anteriormente (apartado 1.2.7), uno de los requisitos para la realización de cálculos de *docking* molecular es la existencia de una estructura cristalográfica del complejo macromolécula-ligando. En nuestro caso utilizamos como punto de partida los complejos que se representan en la figura 3.11 correspondientes al sitio A del RNAr 16S con la kanamicina A (pdb:2esi) y al centro de reconocimiento de las enzimas ANT(4') con kanamicina A (pdb:1kny), APH(3') con este mismo antibiótico (pdb:1nd4) y AAC(6') con la ribostamicina (pdb:2bue).

Figura 3.11.- Estructuras cristalográficas de los complejos: (a) ARNr-kanamicina A (pdb:2esi), (b) ANT(4')-kanamicina A (1kny), (c) APH(3')-I-kanamicina A (1nd4) y (d) AAC(6')-ribostamicina (2bue).



En una primera fase, y con el objetivo de validar el método de cálculo, se estudió la capacidad de unión del sustrato natural kanamicina A con los receptores mostrados en la figura 3.11, comparando las estructuras del antibiótico calculadas con las cristalográficas.

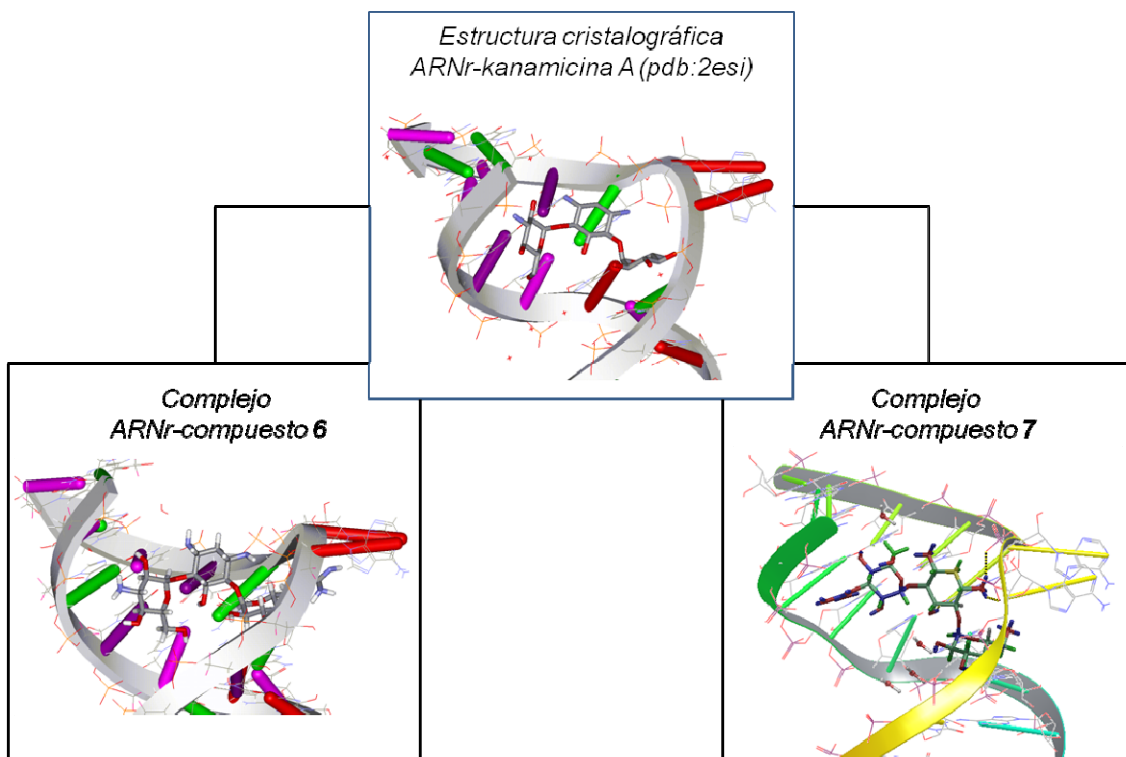
Los resultados obtenidos presentaron una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.3 Å entre las estructuras obtenidas y las cristalográficas, lo que hacía fiable la aplicación de este método computacional para el estudio de los guanidino-glicósidos.

Sin embargo, un dato a tener en cuenta es que el análisis de las diversas estructuras obtenidas reveló la existencia de muchas de ellas que se alejaban notoriamente de la conformación cristalográfica (falsos positivos). Esto se debe a la presencia de una alta densidad de carga tanto en el antibiótico (positiva) como en la macromolécula (negativa), lo que da lugar a falsas interacciones electrostáticas entre los aminos del ligando y los fosfatos del ARNr o sobre zonas ricas en glutámicos y aspárticos en las proteínas.

Una vez validado el método llevamos a cabo cálculos de docking usando como macromolécula el ARNr y como ligandos los compuestos **49** y **50**, con el objetivo de determinar su modo de unión a su diana molecular. Recordemos que ya previamente habíamos llegado a la conclusión de que entre los diferentes guanidino-glicósidos preparados, los únicos que presentaron buenos valores de actividad biológica frente a cepas no resistentes fueron los mono-guanidino-glicósidos **49** y **50**.

En la Figura 3.12. se muestra la estructura cristalográfica del complejo ARNr-kanamicina (pdb:2esi) y las estructuras obtenidas en nuestro estudio de los compuestos **49** y **50** en complejo con ARNr, observándose un modo de unión muy similar de estos ligandos y del sustrato natural en el surco mayor del ARNr. Más concretamente los anillos I y II se unen de manera casi idéntica, observándose las mayores diferencias en la colocación del anillo III.

Figura 3.12.- Estructuras obtenidas para los complejos formados por el ARNr y los compuestos **49** y **50** y estructura cristalográfica de referencia.

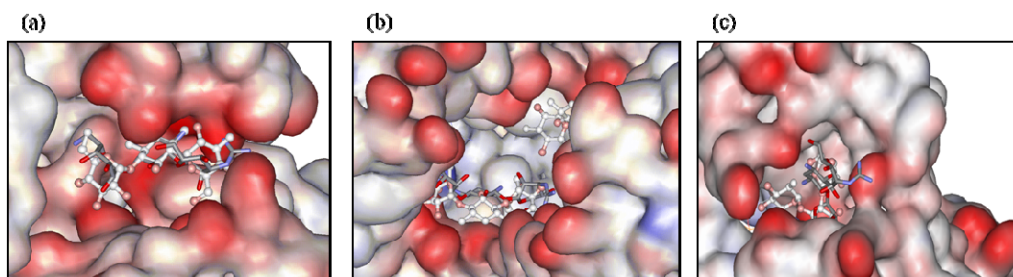


Finalmente, para el caso del compuesto **50** se llevaron a cabo también estudios de *docking* molecular empleando como macromoléculas las enzimas modificadoras ANT(4'), APH(3') y AAC(6'). Recordemos que este compuesto es el único que

presentaba buenas actividades biológicas incluso en cepas que contienen estas enzimas de resistencia. El estudio se realizó en el centro catalítico de las mismas^{169 170 171} con el objetivo de poder especular acerca de cómo una sustitución puntual en la posición 3'' del antibiótico puede afectar al fenómeno de resistencia.

Sin embargo, a partir de los cálculos realizados (figura 3.13) únicamente fue posible concluir que el compuesto **50** reconoce la misma zona de unión que el sustrato natural, pudiendo ser acomodado por el enzima de una forma similar. Además, en los tres casos el antibiótico se coloca en el centro catalítico, en una posición adyacente a bases catalíticas

Figura 3.12.- Estructura del compuesto **50 y de la kanamicina A superpuestas en complejo con (a) la APH(3'), (b) la ANT(4') y (c) la AAC(6').**



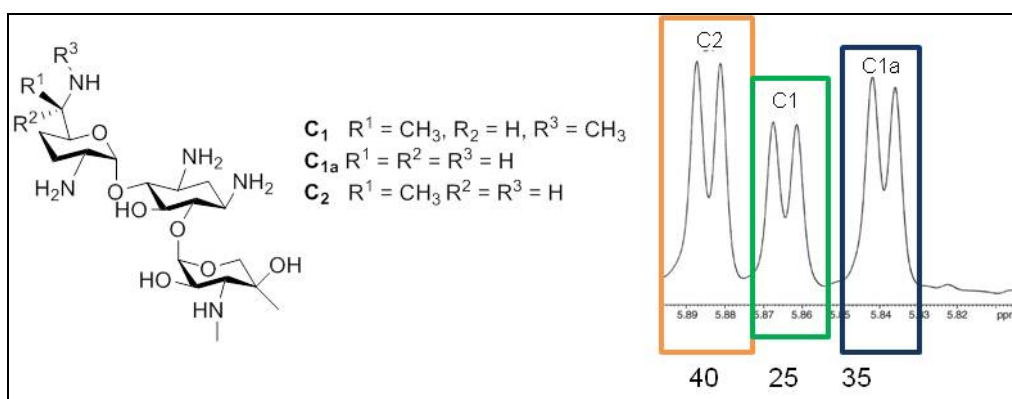
El antibiótico se coloca en una zona cargada negativamente en todas las enzimas, siendo el sitio de fosforilación, adenilación, o acetilación adyacente a las bases catalíticas Asp190 en la APH(3'), Asp 145 en la ANT(4') y Asp 115 en la AAC(6')-Ib lo que explicaría la inactivación parcial de estos derivados por las diferentes enzimas, hecho que ya había sido demostrado en el apartado 3.3.2 de esta Memoria.

3.3.5. Síntesis de los guanidino-glicósidos derivados de gentamicina.

De los datos obtenidos hasta el momento, y a modo general, se puede concluir que la sustitución puntual del amino 3'' de la kanamicina A por un guanidinio puede ser una estrategia adecuada para la preparación de nuevos antibióticos. Esto puede argumentarse en base a que por una parte se mantiene la actividad antibiótica y además, aunque no es suficiente por sí misma, esta modificación resulta relevante en la actividad enzimática.

Con el fin de estudiar si este resultado era extrapolable a otros antibióticos aminoglicósidos 4,6-disustituídos nos planteamos la introducción de un grupo guanidinio en el amino 3'' de la gentamicina, cuya elección se hizo en base a las razones expuestas en el apartado 3.2 de este capítulo. La gentamicina comercial disponible es una mezcla de varios congéneres C1, C1a y C2, que se diferencian entre ellos únicamente por la presencia de un metilo o amino en los sustituyentes R¹, R² y R³ del anillo de purpurosamina (anillo I) (figura 3.13), cuya proporción depende de las condiciones de fermentación y de la purificación posterior.

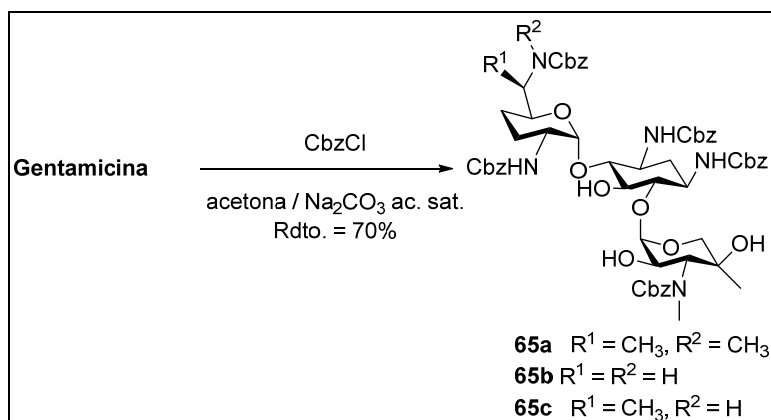
Figura 3.13. Estructura de las gentamicinas presentes en la mezcla comercialmente disponible y proporción determinada por ¹H-RMN



Aunque recientemente han sido publicados diversos métodos para la separación de los mismos,^{158, 172} sin embargo, se trata de procedimientos largos y tediosos con rendimientos bajos. Por este motivo decidimos abordar inicialmente la síntesis utilizando como producto de partida la mezcla de tres congéneres C2:C1:C1a en la proporción 45:25:35 que fue deducida mediante integración de las señales de los protones H-1 de cada uno de los compuestos (figura 3.13) y que a partir de ahora denominaremos gentamicina.

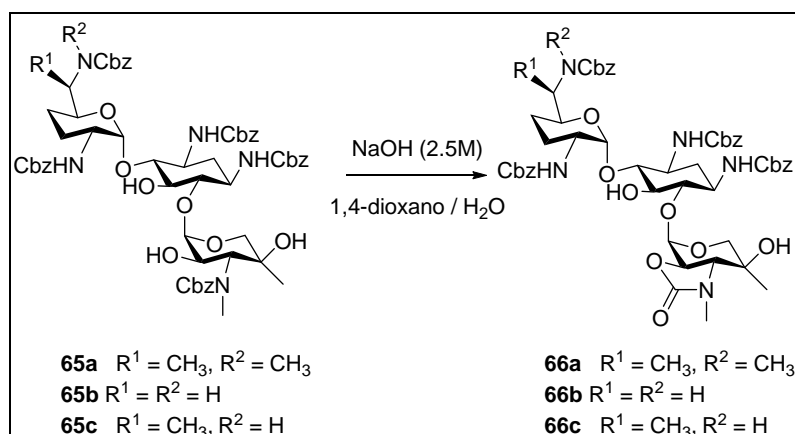
La estrategia diseñada inicialmente para la preparación de los 3''-guanidinio derivados de gentamicina era muy similar a la empleada para la síntesis de **50**. Tras la neutralización del sulfato comercial con Amberlita® 400 (HO⁻) la gentamicina en forma de base libre se trató en una mezcla de acetona y una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃, obteniendo **65a-c** con un rendimiento del 70% (esquema 3.12).

Esquema 3.12. Síntesis de 65a-c



El siguiente paso fue la desprotección de la posición 3'' mediante eliminación regioselectiva en medio básico del grupo benciloxicarbonilo, según el procedimiento descrito anteriormente. En este punto cabe destacar que en el caso de la gentamicina la eliminación del grupo protector de la posición 3'' era la única posible en estas condiciones ya que el resto de los grupos amino no tienen un hidroxilo en posición α , requisito fundamental para que la desprotección tenga lugar.^{161f}

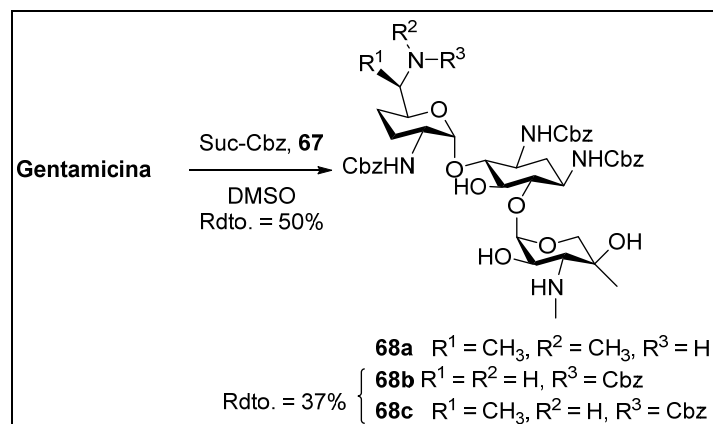
Por este motivo decidimos llevar a cabo la desprotección de **65a-c** con una disolución acuosa de NaOH (2.5M) en una mezcla de 1,4-dioxano y H_2O a 50 °C. La purificación de **66a-c** mediante cromatografía en columna llevó a la obtención de un sólido blanco que, a la vista del espectro de ^1H -RMN parecía coincidir con el producto de desprotección en 3''. Sin embargo, al registrarse el espectro de masas (Electrospray, modo positivo) se observaron tres picos moleculares a m/z 906 $(\text{M}+1)^+$, 892 $(\text{M}+1)^+$ y 878 $(\text{M}+1)^+$ que fueron identificados como los intermedios de tipo uretano de la reacción de desprotección (esquema 3.13).

Esquema 3.13. Desprotección de la posición 3'' de los derivados de gentamicina **65a-c**

Con objeto de solucionar este inconveniente decidimos ensayar la reacción de desprotección utilizando una mayor concentración de NaOH y una base más fuerte como el KOH. En el primer caso no se observó la desprotección del uretano, mientras que el tratamiento con el hidróxido de potasio daba lugar a la descomposición del producto. Estos resultados nos llevaron al diseño de una nueva ruta sintética, cuya etapa clave resultó ser la protección regioselectiva de los aminos primarios de la gentamicina frente a los secundarios.

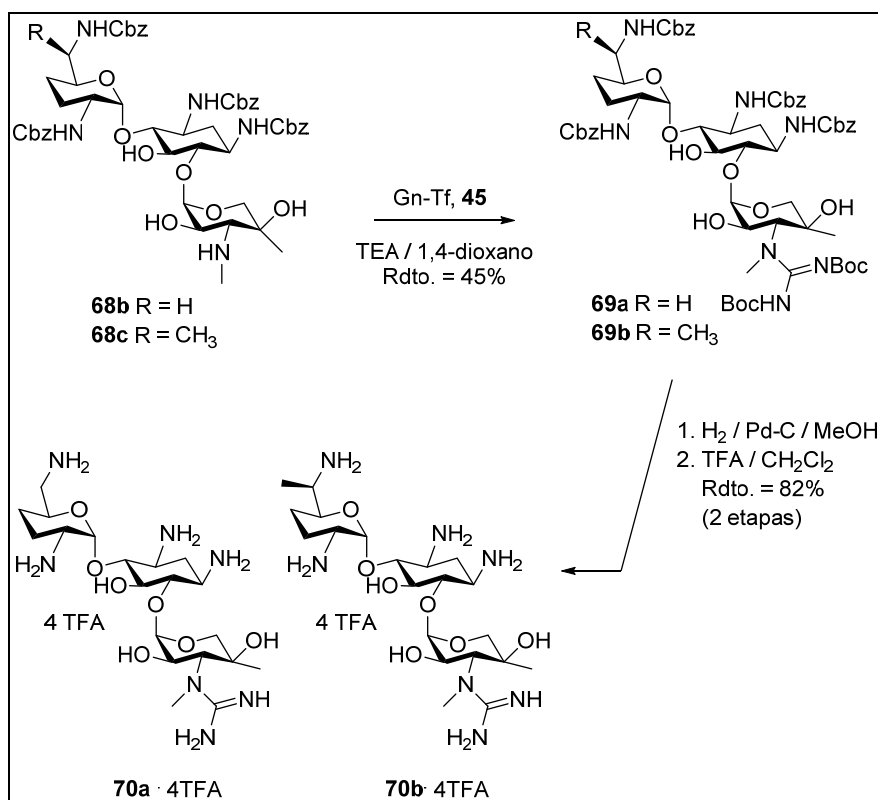
Para ello, y basándonos en precedentes bibliográficos recientes,¹⁷³ decidimos utilizar como reactivo para la protección el N-Cbz-succinimida (Suc-Cbz, **67**). Así se llevó a cabo la reacción de gentamicina con 4.4 equivalentes de **67** (1.1 equivalentes por grupo amino) en DMSO obteniendo el derivado **68a** con los aminos 6' y 3'' desprotegidos y los **68b** y **68c** que únicamente mantenían sin proteger los aminos de la posición 3'' (esquema 3.14).

Esquema 3.14. Protección regioselectiva de los grupos amino primarios frente a los secundarios



La columna cromatográfica utilizando como sistema de eluyentes $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (3:2:1) permitió el aislamiento de los derivados **68b** y **68c** como una mezcla con un rendimiento del 37%, hecho que resultó de gran utilidad para poder llevar a cabo la mono-guanidinilación en posición 3'' de manera regioselectiva.

La posterior guanidinilación de los mismos, empleando para ello **45** como agente guanidinilante y TEA en 1,4-dioxano, según las condiciones ya descritas anteriormente en esta Memoria, dio lugar a la mezcla de compuestos **69a** y **69b**, que fue desprotegida en una secuencia de dos etapas (esquema 3.15). En la primera de ellas se eliminaron los grupos benciloxycarbonilos mediante hidrogenación catalítica, en MeOH a temperatura ambiente y en presencia de Pd-C. Finalmente, el tratamiento con TFA en CH_2Cl_2 de la mezcla obtenida condujo a la mezcla **70a** y **70b** en forma de sales con un rendimiento del 37% (tres etapas).

Esquema 3.15. Síntesis de los derivados 3''-guanidinio de la gentamicina 70a y 70b

3.3.6. Actividades “*in vivo*” con cepas resistentes y no resistentes a enzimas modificadoras de los guanidino-glicósidos 70a y 70b.

Tras la síntesis de los derivados **70a** y **70b** se llevaron a cabo ensayos de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con diferentes cepas hospitalarias procedentes de pacientes del Hospital Universitario de Fuenlabrada. En el caso de la gentamicina se observó que se trata de un antibiótico muy potente con valores de CIM del orden de 0.5 µg/mL, no presentando una gran problemática de resistencia por inactivación enzimática, debido a la ausencia de grupos modificables en muchas posiciones del anillo I y a la particularidad estructural del anillo III.

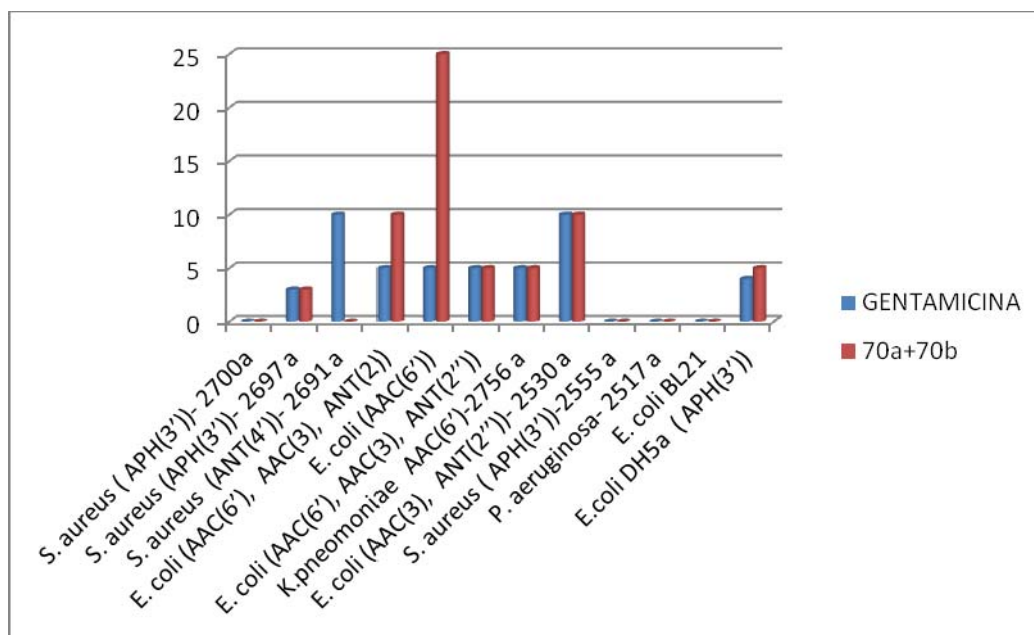
A partir de estos datos y, tal como se desprende de los valores de CIM obtenidos para los derivados **70a** y **70b**, la introducción de un guanidinio sobre la posición 3'' no varió su actividad antibiótica ni en cepas que no presentaban resistencia y lo que es más importante ni en las cepas resistentes ensayada. Este resultado es muy positivo si se tiene en cuenta que la modificación puntual de los antibióticos naturales en la mayoría de los casos da lugar a una pérdida de su actividad antibiótica.

Tabla 3.4. Concentración Inhibitoria Mínima de kanamicina A y de los guanidinio-aminoglicósidos **70a** y **70b** frente a cepas bacterianas resistentes y no a enzimas modificadoras de aminoglicósidos

<i>Cepas</i>	<i>CIM (µg/mL)</i>	
	Gentamicina	70a + 70b
<i>S. aureus</i> (APH(3'))- 2700 ^a	0.5	0.5
<i>S. aureus</i> (APH(3'))- 2697 ^a	<5	<5
<i>S. aureus</i> (ANT(4'))- 2691 ^a	>10	>10
<i>E. coli</i> (AAC(6'), AAC(3), ANT(2))	5	10
<i>E. coli</i> (AAC(6'))	<5	25
<i>E. coli</i> (AAC(6'), AAC(3), ANT(2''))	5	5
<i>K.pneomoniae</i> AAC(6')-2756 ^a	5	5
<i>E. coli</i> (AAC(3), ANT(2''))- 2530 ^a	10	10
<i>S. aureus</i> (APH(3'))-2555 ^a	0.5	0.5
<i>P. aeruginosa</i> - 2517 ^a	0.5	0.5
<i>E. coli</i> BL21	0.5	2.5
<i>E.coli</i> DH5α (APH(3'))	4	5

^a numeracion de las cepas Hospitalarias

De una forma más gráfica los valores de CIM's se encuentran representados en la figura 3.8.

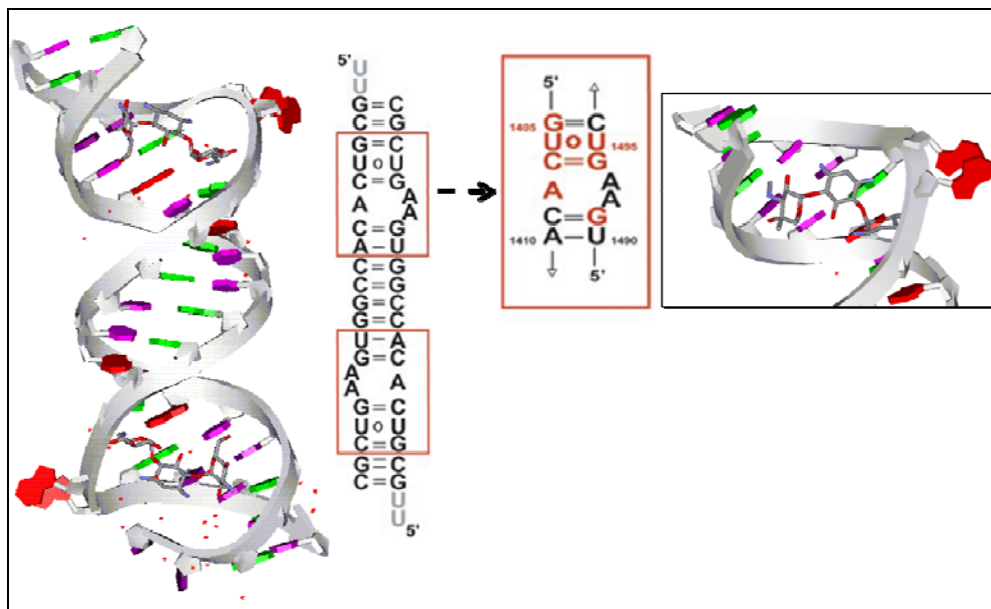
Figura 3.14. Representación gráfica de los valores de CIM recogidos en la tabla 3.4.

A partir de estos datos los compuestos **70a** y **70b**, y si la toxicidad de los guanidinio-glicósidos es menor que la de gentamicina por la presencia del grupo guanidinio, tendrían una actividad antibiótica muy buena, poca resistencia por inactivación y bajos niveles de toxicidad^{138b} lo que los hace muy buenos candidatos como cabezas de serie para el desarrollo de nuevos aminoglicósidos utilizables en clínica.

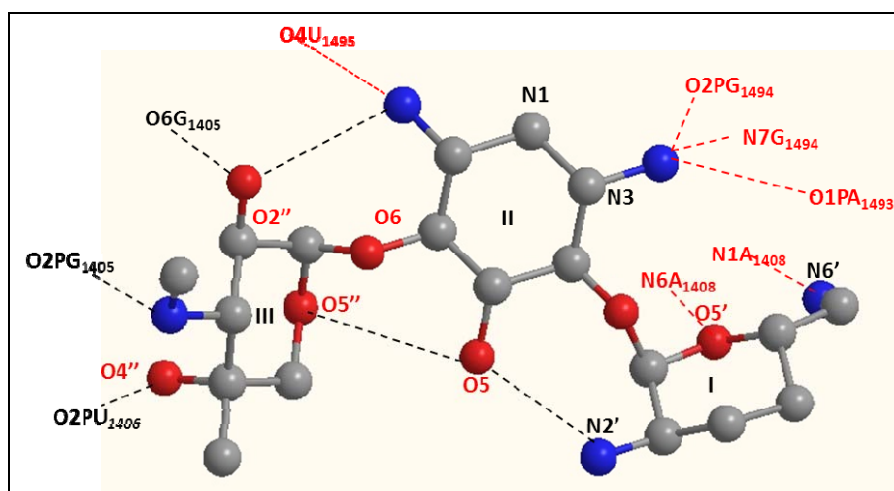
3.3.7. Estudios *in silico* de interacciones ligando-receptor.

A partir de los datos *in vivo* presentados en el apartado anterior podríamos deducir que el modo de unión del derivado de gentamicina será muy similar al de su antibiótico natural al ser una modificación puntual en el anillo III el cual no es esencial para la unión al ARNr y al presentar prácticamente los mismos valores de CIM. Para determinar este modo de unión del nuevo derivado llevamos a cabo estudios de docking entre el sitio A del ARNr y el derivado sintético. Utilizamos el complejo cristalográfico ARNr-Gentamicina con una resolución de 2.5 Å (pdb:2et3)^{65b}, como patrón. Tal como se observa de la figura 3.15, el antibiótico natural se une en el surco mayor y se observan dos unidades de aminoglicósido por unidad de ARNr, hecho común a todas estructuras cristalográficas de complejos ARNr-aminoglicósidos, constituyendo una excepción el caso de la neamina.

Figura 3.15. Vista general del complejo ARNr-Gentamicina, y su estructura secundaria de la hélice ARNr cristalizada. Los dos sitios A están enmarcados en un cuadrado.

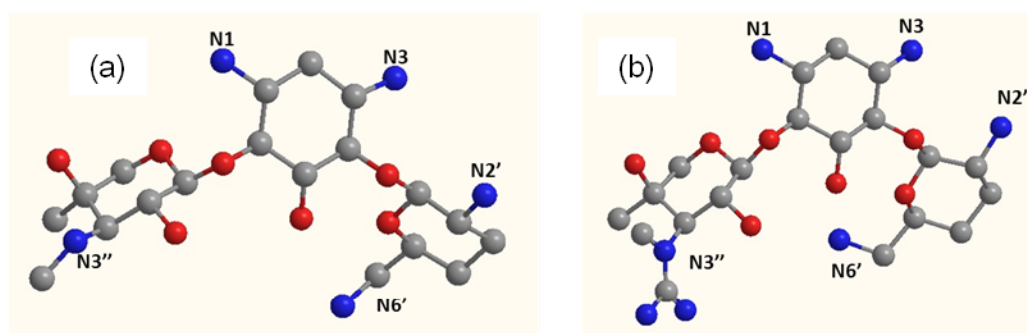


El número de contactos entre el ARNr y los aminoglicósidos es variable entre 20 y 31 dependiendo del antibiótico considerado. De todos estos contactos, sólo 8 son conservados entre los anillos I-II con el ARNr. En el caso particular de la gentamicina, un 4,6-derivado, donde los anillos I y II son muy parecidos al que presenta la neamina, exceptuando el carácter desoxi de las posiciones 3' y 4' del anillo I se detectaron 6 de esos contactos conservados entre los anillos I-II y el ARNr. La falta de dos contactos conservados se debe a la ausencia en el antibiótico de los grupos hidroxilo en las posiciones 3' y 4' del anillo I. Además se observa la presencia de dos contactos del par de bases U1495·U1496 a través de enlaces de hidrógeno con la posición 4'' del anillo III del antibiótico. Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre con el resto de aminoglicósidos los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el amino de la posición 2' del anillo I y el hidroxilo de la posición 5 del anillo II, responsables en parte del mantenimiento de la conformación de los anillos I y II en el caso de la gentamicina son directos, mientras que en el resto de los antibióticos están mediados por una molécula de agua. En la figura 3.15 se muestran los contactos de la gentamicina con el ARNr, resaltándose en rojo los enlaces de hidrógeno conservados.

Figura 3.16. Estructura adoptada por la gentamicina dentro del dúplex ARNr.

Con objeto de determinar las diferencias estructurales de la gentamicina en el estado asociado (figura 3.16) y en estado libre (figura 3.17a) como primer paso del estudio llevamos a cabo una minimización a nivel MM2 del antibiótico. Los resultados obtenidos mostraron que la conformación en ambos casos era diferente, observándose que los anillos I y III se encuentran girados 180 °C en el estado libre con respecto al estado asociado. Este hecho no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que en nuestro grupo de investigación ya habíamos demostrado que la conformación de los aminoglicósidos libres suele ser distinta a la adoptada en complejo tanto con el ARNr como con las enzimas modificadoras.^{155b, 166a, 174}

Figura 3.17. (a) Conformación de la gentamicina libre minimizada (MM2). (b) Conformación del derivado **70a** en estado libre minimizada (MM2).

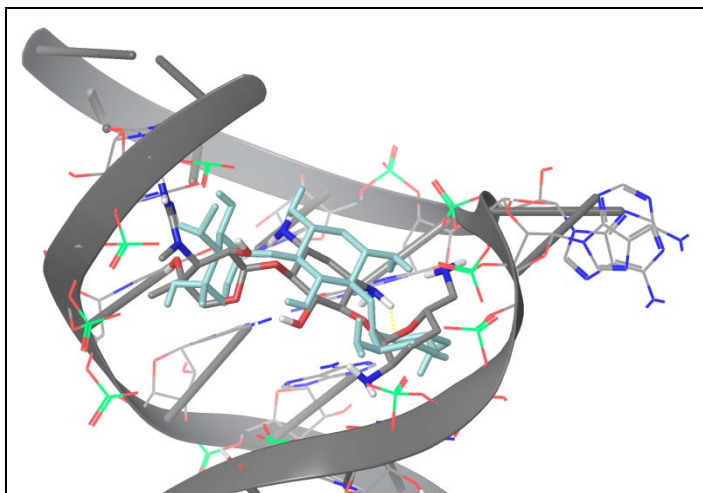


En la figura 3.17b se muestra la estructura minimizada a nivel MM2 del derivado **70a** en estado libre, observándose una estructura idéntica a la que presenta la gentamicina (figura 3.17a).

Posteriormente, y a partir de la estructura minimizada de **70a** llevamos a cabo estudios de reconocimiento molecular entre el antibiótico y el ARNr utilizando la estructura cristalográfica gentamicina-ARNr (2et3) usando el programa Glide.

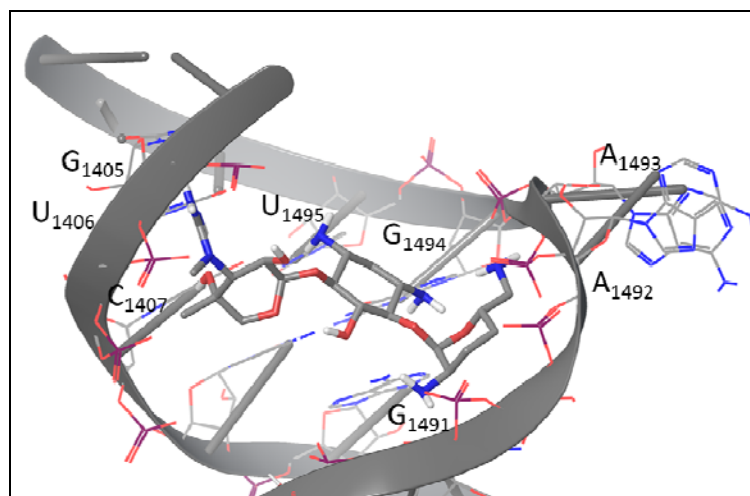
En la figura 3.18 se muestra la estructura del derivado **70a** y de la gentamicina en complejo con el ARN. En ella puede apreciarse que el derivado sintético **70a** reconoce la misma zona de unión que el sustrato natural (surco mayor) y con la misma orientación de sus anillos I-II-III en el sitio de reconocimiento.

Figura 3.18. Estructura obtenida para los complejos gentamicina-ARNr 16S y **70a**-ARNr



En lo que respecta a los contactos intramoleculares, y tal como se muestra en la figura 3.19, no se observan diferencias entre ambos ligandos. Sin embargo, para el caso de los contactos debidos a puentes de hidrógeno intermoleculares se observan algunas diferencias. De hecho en el derivado **70a** se conservan únicamente 4 de los 6 contactos de la gentamicina entre los anillos I –II. Sin embargo, la presencia del grupo guanidinio en el anillo III hace que en este caso en el derivado sintético se incrementen en 2 el número de contactos, lo que hace que en ambos casos el balance global sea el mismo.

Figura 3.19. Contactos observados en el complejo **70a-ARNr**



3.4. Parte experimental

3.4.1. Aspectos generales

3.4.1.1. Productos comerciales y disolventes

Todos los productos comerciales empleados (Acros, Aldrich, Sigma, Fluka y Santa Cruz Biothecnology) fueron usados directamente sin purificación previa salvo que se indique lo contrario en el procedimiento experimental. Los antibióticos comerciales, en forma de sulfato, se neutralizaron mediante un proceso de intercambio iónico en disolución, empleando la resina Amberlita® 400 (HO⁻).

Todos los disolventes utilizados como eluyentes en cromatografía se emplearon de calidad analítica. Cloruro de metileno, tetrahidrofurano, éter dietílico, acetonitrilo, tolueno y dimetilformamida anhidros se prepararon a partir de disolvente de calidad HPLC preparativo y fueron secados con un sistema SPS de Innovative.

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por Pronadisa.

El reactivo de Bradford y la solución de acrilamida/bis-acrilamida 30% 29:1 para preparar geles de poliacrilamida se adquirieron en Bio-Rad, y el patrón de pesos moleculares “Low Molecular Weigth Calibration Kit” en GE Healthcare.

Algunas cepas bacterianas fueron cedidas por el hospital de Fuenlabrada de Madrid.

Las bacterias y vectores plasmídicos utilizados en esta memoria se encuentran resumidos en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Cepas bacterianas y vectores usados en esta Tesis.

Cepa/Plasmido	Genotipo	ATCC/CECT
<i>B. circulans</i>		10
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44 lacI</i> 69 (ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	25922
<i>E. coli</i> BL21	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>galλ</i>	--

(DE3)		
<i>E. faecalis</i>		29212
<i>S. gallolyticus</i>		49147
<i>B. circulans</i>		10
<i>P. euriginosa</i>		15622
<i>S. aureus</i>		29213
<i>D. radiodurans</i>		/13939
<i>MRSA</i>		1228
<i>MRSA</i>		33591
<i>K. pneumonia</i>		2556
<i>S. aureus</i>		2638
<i>E. coli</i>		2323
<i>E. coli DH5α ANT(4')</i>		a
<i>E. coli DH5αPH(3')-IIa</i>		a
<i>E. coli DH5α AAC(6')-Ib</i>		a
Plasmidos		
pGEM [®] -T Easy	3018 pb, Amp ^r , P _{T7} , P _{SP6} , <i>lacZ</i> , f1 ori	Promega

pET-28b(+)	Vector de expresión, 5368 pb, Kan ^r , P _{T7} , <i>lacI</i> , fl ori, secuencia codificadora Novagen para colas de histidinas a ambos lados del sitio de policlonaje, sitio de corte de trombina
------------	---

^a clon producido en nuestro laboratorio.

3.4.1.2. Instrumentación

La cromatografía en capa fina para la monitorización de las reacciones se llevó a cabo sobre placas de silicagel Kiesel 60 F254 sobre aluminio (Merck), visualizando las manchas con luz UV de 254 nm o con los reveladores siguientes: disolución de ácido sulfúrico en etanol al 5% v/v, disolución de molibdato amónico (12 g) y sulfato de cerio 0.5 g en H₂O/H₂SO₄ (250 mL, 15:1 v/v) y disolución de ninhidrina (1 g) en EtOH/n-BuOH (1.1 L, 10/1 v/v).

La cromatografía en columna flash (FCC) se llevó a cabo sobre gel de sílice 60 (40-63 micras) (Merck). La cromatografía radial centrífuga acelerada se llevó a cabo en un Chromatotron® modelo 7924T (Harrison Research, Palo Alto, CA, USA), en placas de 1 ó 2 mm de espesor, con gel de sílice Merck tipo 60 PF 254 con CaSO₄ y utilizando una velocidad de flujo comprendida entre 0.5 y 1.5 mL/min.

Las columnas cromatográficas Glass-Econo-Column® (Ø = 2.5 cm.) para la purificación de proteína se adquirieron en Bio-Rad, utilizando como relleno una resina de Ni²⁺-agarosa (35-40 µmol Ni²⁺/mL resina) fue suministrada por Agarose Bead Technologies.

Las membranas de diálisis Spectra/Por® adecuadas para la diálisis de proteínas de peso molecular superior a 12000-14000 Da, son de la marca Spectrum.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se registraron en los siguientes espectrómetros: Bunker AMX-300 (300 MHz), Varian INOVA 300 (300 MHz), INOVA 400 (400 MHz), MERCURY 400 y Varian UNITY 500 (500 MHz). Se emplearon disolventes deuterados comerciales sin purificación previa.

Los espectros de masa de resolución baja y alta fueron tomados en un Hewlett-Packard HP-5973 MSD y HP-1100 MSD y en un espectrómetro Agilent 6520 LC masa exacta QTOF usando técnicas de Electrospray en modo positivo.

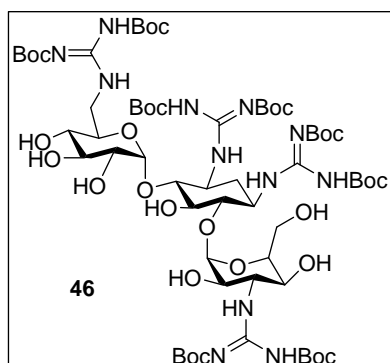
Los cultivos celulares se incubaron en un agitador orbitálico termostatzado Lab-Shaker de Adolf Kühner AG, y las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro VIS-UV SPECTRAmax-384 PLUS de Molecular Devices.

Las reacciones enzimáticas se analizaron en un HPLC Jasco PU-2089 Plus con un detector de absorbancia Jasco UV-2075 Plus.

Las muestras de proteína pura se liofilizaron en un liofilizador Lioalfa 6 de Telstar. Los estudios de T_m de las proteínas libres y con los ligandos se llevaron a cabo en un aparato de PCR-TR MJ Mini de Biorad.

3.4.2. Síntesis de 1,3,6',3''-tetra-guanidinio-kanamicina A, **44**.

3.4.2.1.- 1,3,6',3''-Tetra-guanidino(Boc)₈ kanamicina A, **46**



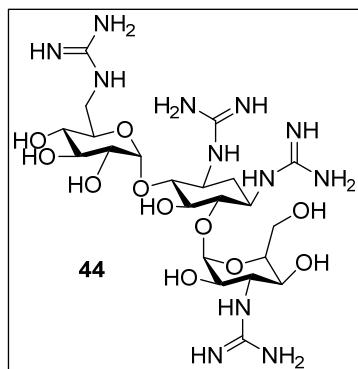
Sobre una suspensión de kanamicina A en su forma de base libre (50 mg, 0.105 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano/H₂O (7 mL, 5:1 v/v) bajo atmósfera de Ar se añadió Gn-Tf (**45**) (330 mg, 0.84 mmol) y TEA (0.17 mL, 1.26 mmol). La mezcla se agitó vigorosamente durante 62 h. a t.a., tras las cuales se llevó a sequedad a presión reducida en el rotavapor. Sobre el residuo se

añadió CH₂Cl₂ (10 mL) y una disolución 1M acuosa de NH₄Cl (10 mL) y se separaron las fases. La orgánica se lavó posteriormente con una solución acuosa de NaCl sat. (2 x 10 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. La cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂→CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) del crudo proporcionó el compuesto **46** (94 mg, 61 %) como una espuma blanca.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 11.52 (s, 1H), 11.45 (s, 1H), 11.43 (s, 1H), 11.34 (s, 1H), 8.91 (br s, 1H), 8.43-8.39 (m, 2H), 8.29 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 5.65 (br s, 1H), 5.41 (s, 1H), 5.06 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.96 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 4.49-4.41 (m, 1H), 4.32 (dd, *J* = 17.6, 7.6 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 9.0, 7.9 Hz, 1H), 4.10-4.00 (m, 3H), 3.93 (dd, *J* = 11.5, 1.8 Hz, 1H), 3.83-3.74 (m, 2H), 3.69-3.64 (m, 2H), 3.58-3.54 (m, 1H), 3.52-3.45 (m, 3H), 3.38-3.33 (m, 2H), 3.12-3.06 (m, 3H), 2.98 (dd, *J* = 13.7, 4.3 Hz, 1H), 2.74 (br s, 1H), 2.34 (ddd, *J* = 11.9, 4.0, 4.0 Hz, 1H), 1.90 (br s, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.46 (s, 27H), 1.44 (s, 9H), 1.42 (s, 18H).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 163.1, 162.8, 162.1, 161.5, 158.1, 157.4, 156.3, 155.9, 153.1, 153.0, 152.5 (2C), 101.7, 97.9, 85.1, 83.91, 83.89, 83.8, 83.6, 83.5, 80.3, 80.0 (2C), 79.8, 74.8, 73.0, 72.8, 72.3, 71.8, 71.5, 70.0, 69.1, 62.2, 57.6, 49.5, 48.9, 41.0, 34.2, 28.3 (3C), 28.2 (3C), 28.14 (6C), 28.07 (9C), 28.0 (3C).

MS-API-ES: 1476 (M + Na)⁺.

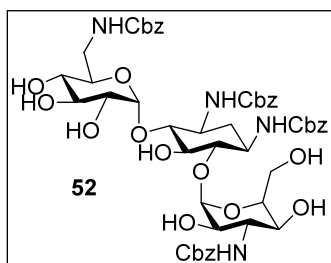
3.4.2.2.- 1,3,6',3''-Tetra-guanidino-kanamicina A, **44**

Sobre una disolución de **46** (94 mg, 0.065 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) bajo atmósfera de Ar se añadió TFA (1 mL) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 5 h. La reacción se detuvo mediante la evaporación del disolvente a vacío y sucesivamente se co-evaporó con tolueno 3 veces. El crudo de la reacción se disolvió en agua y el sobrenadante claro se tomó y se liofilizó obteniéndose la sal de TFA del compuesto **44** como un sólido blanco (69 mg, 96%).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ: 8.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36- 7.14 (m, 13H), 5.71 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.56 (s, 1H), 5.45 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.40 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.38 (dd, *J* = 6.8, 6.8 Hz, 1H), 3.94 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.55-3.24 (m, 15H), 3.11-3.08 (m, 1H), 1.92 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 1.50-1.41 (m, 1H);

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) δ: 158.1, 157.5, 156.5, 156.4, 101.1, 97.7, 83.8, 79.3, 74.5, 72.7, 72.2, 72.0, 70.4, 69.9, 69.3, 67.7, 59.7, 57.5, 51.0, 49.8, 41.2, 34.1.

MS-API-ES: 653 (M + H)⁺.

3.4.3. Síntesis de 6',3''-di-guanidino-kanamicina A, **47**3.4.3.1.- 1,3,6',3''-(Cbz)₄-kanamicina A, **52**

Sobre una disolución de Kanamicina A en su forma de base libre (3.00 g, 5.15 mmol) en una disolución acuosa de Na₂CO₃ sat. (40 mL) a 0 °C se añadió durante 30 min. una disolución de CbzCl (4.25 g, 24.92 mmol) en acetona (15 mL). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 2 h. en baño de hielo y 8 h. a temperatura ambiente, observándose en el transcurso de la reacción la formación de un sólido blanco que fue filtrado al final de la misma y que contenía el producto final y Na₂CO₃. Para obtener el compuesto **52** en forma pura este sólido se pulverizó en un mortero y se añadió sobre una disolución acuosa 1M de HCl,

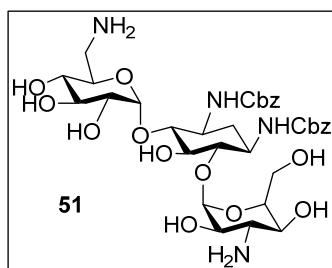
de manera que el Na_2CO_3 se neutralizó y se disolvió en el medio y el producto deseado precipitó. La filtración a vacío y posterior secado del sólido proporcionó el compuesto **52** como un sólido blanco (4.14 g, 84%).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 7.37-7.31 (m, 21H), 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.84 (br s, 1H), 5.47 (br s, 2H), 5.00-4.80 (m, 11H), 4.22 (dd, $J = 5.4$, 4.8 Hz, 1H), 3.86-3.83 (m, 2H), 3.57-3.25 (m, 10H), 3.08-3.06 (m, 1H), 1.83 (br s, 1H), 1.51-1.39 (m, 1H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 156.6, 156.5, 155.8, 155.6, 137.3, 137.1, 137.0, 128.3, 127.7, 127.5, 101.1, 98.5, 84.3, 80.2, 74.1, 72.8, 72.6, 72.3, 70.6, 70.4, 70.0, 67.0, 65.3, 65.0, 60.1, 56.5, 50.0, 49.6, 41.6, 34.4.

MS-API-ES: 1038 ($\text{M} + \text{NH}_4$) $^+$.

3.4.3.2.- 1,3-(Cbz) $_2$ -kanamicina A, **51**



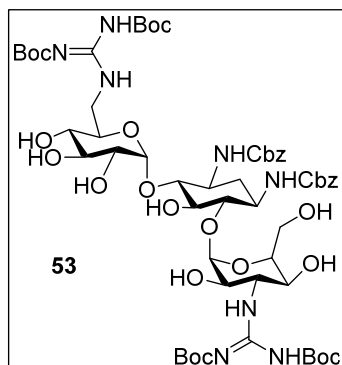
Sobre una disolución de **52** (1.0 g, 0.98 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano/ H_2O (100 mL/30 mL), se añadió una disolución acuosa 2.5 M de NaOH (30 mL). La mezcla resultante se agitó durante 24 horas a 50 $^\circ\text{C}$, tras las cuales se añadió una disolución acuosa de HCl 1 M para ajustar el pH a 10. Tras la eliminación del disolvente a presión

reducida se añadió H_2O . El sólido resultante se filtró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 8:2:0.2 \rightarrow 6:3:1) obteniéndose el compuesto **51** como un sólido blanco (0.63 g, 85%).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 7.34 (s, 11H), 7.19 (br s, 1H), 5.52 (br s, 1H), 4.94-4.81 (m, 7H), 4.28-4.24 (m, 2H), 3.72 (br s, 1H), 3.05 (s, 4H), 2.79 (br s, 2H), 1.92-1.89 (m, 1H), 1.40-1.33 (br s, 1H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 155.8, 155.6, 137.2, 136.9, 128.3, 127.8, 127.5, 127.1, 101.2, 97.5, 84.6, 80.1, 74.8, 72.9, 72.8, 72.7, 72.6, 72.5, 71.2, 69.5, 65.4, 65.2, 60.5, 55.1, 50.2, 49.5, 42.7, 34.9

MS-API-ES: 753 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

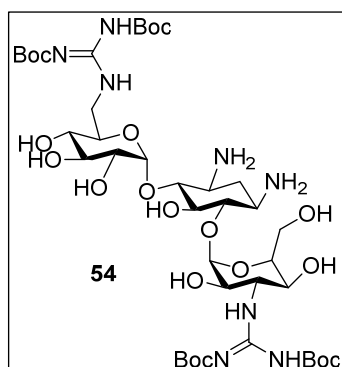
3.4.3.3.- 1,3 –(Cbz)₂-6',3''-di-guanidino(Boc)₄ kanamicina A, **53**

Sobre una disolución del compuesto **51** (200 mg, 0.266 mmol) en 1,4-dioxano (13.5 mL) se añadió Gn-Tf (**45**) (312 mg, 0.798 mmol) y TEA (0.22 mL, 1.60 mmol) y se dejó agitando a t.a. durante 5 días. Finalizada la reacción el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se purificó en columna cromatográfica de sílica gel (AcOEt→AcOEt/MeOH 95:5) obteniéndose el compuesto **53** como una espuma blanca (207 mg, 63%).

¹H RMN (MeOD-*d*₄, 300 MHz) δ: 7.35 (m, 10H), 5.23-4.75 (m, 6H), 4.25 (dd, *J*=9.6, 9.6 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.85-3.40 (m, 16H), 3.15 (dd, *J*=9.3, 9.3 Hz, 1H), 2.15-2.05 (m, 1H), 1.60-1.35 (m, 37H).

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz) δ: 164.1, 163.8, 159.5, 158.5, 158.0, 157.9, 154.4, 154.1, 138.2, 137.9, 129.5, 129.4, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 102.7, 99.9, 85.7, 85.5, 84.9, 82.8, 80.8, 80.6, 76.9, 74.5, 74.3, 74.0, 72.1, 72.0, 71.1, 67.8, 67.7, 62.4, 57.8, 56.1, 52.4, 51.5, 42.8, 35.7, 28.6 (3C), 28.3 (3C).

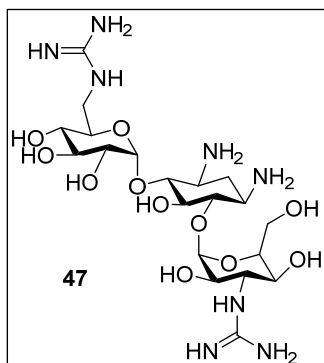
MS-API-ES: 1237 (M+H)⁺.

3.4.3.4.- 6',3''-Di-guanidino(Boc)₄ kanamicina A, **54**

Sobre una disolución de **53** (200 mg, 0.167 mmol) en MeOH (3.4 mL), se añadió Pd-C al 20% (40 mg, 20% w/w) y AcOH (1 mL). La mezcla se mantuvo bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 12 h. Una vez finalizada la reacción el catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y la disolución resultante se concentró a presión reducida en el rotavapor. El crudo resultante se purificó en columna de cromatografía en sílica gel (CHCl₃/MeOH/NH₄OH, 8:2:0.2 → 6:3:1) obteniéndose una mezcla de productos que contenía el derivado tetra y diferentes tri-*tert*-butoxi-carbonil derivados como un aceite incoloro, que se empleó directamente en la reacción posterior.

MS-API-ES: 969 (M+H)⁺ (compuesto **54**), 869 (M+1)⁺ (**55a** y **55b**).

3.4.3.5.- 6',3''-di-guanidino-kanamicina A, **47**



Sobre una disolución del crudo de la reacción precedente en CH_2Cl_2 (2.0 mL) bajo atmósfera de Ar se añadió TFA (0.5 mL) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 5 h. La reacción se detuvo mediante la evaporación del disolvente a vacío y sucesivamente se co-evaporó con tolueno 3 veces. El crudo de la reacción se disolvió en agua y el sobrenadante claro se tomó y se liofilizó obteniéndose la sal de TFA del compuesto **47** como un sólido blanco (155 mg, 91% sobre dos etapas).

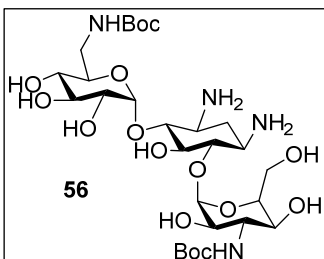
^1H RMN (D_2O , 400 MHz) δ : 5.50 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.96-3.45 (m, 18H), 3.35 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H), 2.49 (ddd, $J = 12.3, 4.0, 4.0$ Hz, 1H), 1.86 (ddd, $J = 12.6, 12.6, 12.3$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (D_2O , 100 MHz) δ : 158.3, 157.9, 101.0, 97.6, 83.9, 79.0, 72.9, 72.9, 72.3, 71.4, 71.0, 70.3, 69.7, 67.6, 60.2, 57.6, 49.9, 48.2, 41.8, 27.7.

MS-API-ES: 569 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

3.4.4. Síntesis de 1,3-Di-guanidino-kanamicina A, **48**

3.4.4.1.- 6'3''-(Boc)₂kanamicina A, **56**



Sobre una disolución del compuesto **51** (100 mg, 0.133 mmol) en DMF anhidra (6.6 mL) se añadió gota a gota una disolución de Boc_2O (116 mg, 0.532 mmol) en DMF (2 mL) y TEA (0.11 mL, 0.80 mmol, 3 eq/amina). La mezcla se agitó bajo atmósfera de Ar durante 18 h. a 50 °C. La reacción se detuvo mediante la evaporación del disolvente y sobre el residuo se añadió una disolución acuosa de HCl 1M (20 mL) y se extrajo dos veces con AcOEt (2 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaCl sat. (2 x 20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a presión reducida, obteniéndose un aceite incoloro, que se empleó sin purificación. MS-API-ES: 953 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Éste se disolvió en MeOH (5.4 mL) y se añadió Pd-C al 20% (25 mg, 20% w/w) y ácido acético (1 mL). La mezcla se mantuvo bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 6

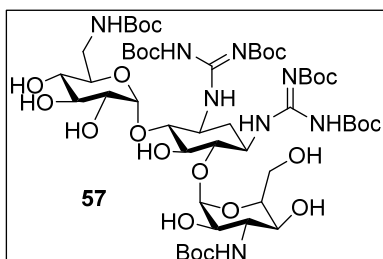
h., hasta la total desaparición del producto de partida. Una vez finalizada la reacción el catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y la disolución resultante se concentró a presión reducida en el rotavapor. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 8:2:0.2 \rightarrow 6: 3: 1), obteniéndose el compuesto **56** como un sólido blanco (75 mg, 83% dos etapas).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 5.44 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 5.26 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 4.31-4.28 (m, 1H), 4.19 (dt, $J = 9.0, 1.9$ Hz, 1H), 4.14-4.08 (m, 1H), 4.05-3.80 (m, 4H), 3.71 (td, $J = 9.9, 6.6$ Hz, 1H), 3.62 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.56 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.52-3.40 (m, 2H), 3.33-3.20 (m, 2H), 3.18-3.05 (m, 3H), 2.37 (dt, $J = 12.5, 4.1$ Hz, 1H), 1.90 (s, 18H), 1.60 (q, $J = 12.5$ Hz, 1H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 157.2, 155.3, 120.3, 119.1, 101.8, 79.2 (2C), 76.0, 73.9, 73.7, 68.5, 65.7, 58.6, 58.0, 57.4, 56.7, 55.0, 48.8 (2C), 46.3, 36.0, 29.0 (3C), 28.9 (3C).

MS-API-ES: 684 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

3.4.4.2.- 1,3-di-guanidino(Boc) $_4$ -6',3''-(Boc) $_2$ -kanamicina A, **57**



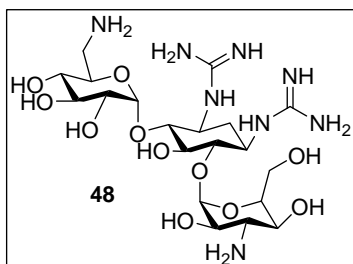
Sobre una disolución del compuesto **56** (45 mg, 0.064 mmol) en 1,4-dioxano (3.2 mL) se añadió GN-Tf (**45**) (151 mg, 0.386 mmol) y TEA (54 μL , 0.386 mmol) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 5 días. Finalizada la reacción se evaporó el disolvente a presión reducida y el crudo se purificó por columna cromatográfica en sílica gel ($\text{AcOEt} \rightarrow \text{AcOEt}/\text{MeOH}$ 95:5) obteniéndose el compuesto **57** como una espuma blanca (61 mg, 90%).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 5.35 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.17 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.43-4.22 (m, 2H), 4.10-4.01 (m, 1H), 3.85-3.48 (m, 7H), 3.43-3.30 (m, 2H), 3.18 (dd, $J = 9.3, 9.3$ Hz, 1H), 3.10-2.95 (m, 1H), 2.25-2.15 (m, 1H), 1.60-1.35 (m, 55H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 162.9, 162.7, 158.4 (2C), 156.9 (2C), 153.0 (2C), 101.6, 100.3, 89.5, 87.9, 84.3 (2C), 83.7, 83.6, 79.6 (2C), 79.4 (2C), 74.6, 73.7, 73.2, 73.0, 71.6, 71.3, 71.2, 56.7, 50.9, 50.0, 41.7, 35.6, 27.4 (12C), 27.2 (6C).

MS-API-ES: 1053 (M+H)⁺.

3.4.4.3.- 1,3-Di-guanidino-kanamicina A, **48**



Sobre una disolución del compuesto **57** (61 mg, 0.052 mmol) en CH₂Cl₂ (4 mL) bajo atmósfera de Ar se añadió TFA (1 mL) y la mezcla de reacción se dejó en agitación a t.a. durante 5 h. La reacción se detuvo mediante la evaporación del disolvente a vacío y sucesivamente se co-evaporó con tolueno 3 veces. El crudo de la reacción se disolvió en agua y el sobrenadante claro se tomó y se liofilizó obteniéndose la sal de TFA del compuesto **48** como un sólido blanco (50 mg, 85%).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz) δ: 5.57 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 5.17 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.05 (ddd, *J* = 9.9 Hz, 3.1, 3.1, 1H), 3.86-3.78 (m, 4H), 3.77-3.57 (m, 7H), 3.46-3.38 (m, 2H), 3.35 (dd, *J* = 13.7, 4.5 Hz, 1H), 3.31 (dd, *J* = 13.7, 4.0, Hz, 1H), 2.26 (ddd, *J* = 6.4, 3.4, 3.4 Hz, 1H), 1.69 (ddd, *J* = 12.6, 12.6, 6.4Hz, 1H).

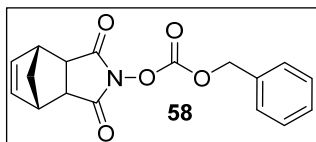
¹³C RMN (D₂O, 125 MHz) δ: 156.4, 99.0, 98.0, 80.8, 80.4, 74.8, 72.3, 72.0, 70.9, 69.6, 68.1, 67.7, 65.3, 59.4, 54.9, 51.3, 50.1, 39.4, 32.6.

MS-API-ES: 569 (M+H)⁺.

3.4.5. Síntesis de 6'-Guanidinio-kanamicina A, **49**

3.4.5.1. Procedimiento 1

*3.4.5.1a. N-Cbz-5-norborneno-endo-2,3-dicarboximida (HONB-Cbz), **58***



Sobre una disolución de N-hidroxi-5-norborneno-endo-2,3-dicarboximida (HONB) (0.5 g, 3 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) se añadió gota a gota TEA (0.6 mL, 4.2 mmol) y la reacción se mantuvo a t.a. hasta la total disolución del HONB. Posteriormente la mezcla se enfrió hasta 0 °C se añadió gota a gota el CbzCl (0.5 g, 3.0 mmol). La mezcla se agitó durante 12 h. y posteriormente el volumen de disolvente se redujo hasta unos 5 mL, observándose la precipitación de sales blancas, que fueron eliminados mediante filtración a vacío. El filtrado se lavó con agua (2 x 10 mL), la fase orgánica se secó

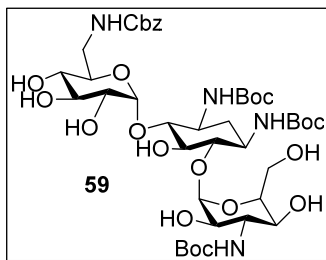
sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniendo el compuesto **58** (0.87 g, 93%) como un sólido blanco con la pureza necesaria para su utilización en la reacción posterior.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.36 (s, 5H), 6.15 (br s, 2H), 5.26 (s, 2H), 3.44 (br s, 2H), 3.30 (br s, 2H), 1.76 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 1.50 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 169.8, 166.3, 135.0, 133.6, 129.4, 129.0, 128.8, 72.7, 51.4, 45.0, 43.3

MS-API-ES: 313 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

3.4.5.2a. 6'-(Cbz)-1,3,3''-(Boc)₃ kanamicina A, **59**



Sobre una disolución de kanamicina A en su forma de base libre (0.55 g, 1.14 mmol) en H_2O (50 mL) se añadió gota a gota una disolución de HONB-Cbz (**58**) (0.35 g, 1.14 mmol) en 1,4-dioxano (50 mL). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 8 h., tras las cuales se eliminó el disolvente a presión

reducida. El crudo de la reacción se purificó por columna cromatográfica en sílica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 5:4:1) obteniéndose 6'-Cbz-Kanamicina A como una espuma blanca (0.458 g, 65%). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 7.4 (m, 5H), 5.04 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.96 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.89 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 9.3$, 9.3 Hz, 1H), 3.10-3.85 (m, 16H), 2.20-2.30 (m, 1H), 1.50-1.70 (m, 1H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 156.7, 137.5, 134.8, 128.8, 128.7, 128.2, 128.1, 101.6, 99.4, 91.2, 87.7, 74.3, 73.6, 73.1, 72.9, 72.4, 72.1, 71.8, 69.5, 65.6, 60.9, 56.2, 51.4, 50.9, 44.3, 38.6. MS-API-ES: 619 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. En una etapa posterior este compuesto se disolvió en DMF anhidra (20 mL) y se añadió gota a gota una disolución de Boc_2O (0.84 g, 3.84 mmol) en DMF (12 mL) y TEA (0.8 mL, 5.76 mmol). La mezcla de resultante se agitó bajo atmósfera de Ar a 50 °C durante toda la noche. A continuación se evaporó el disolvente a presión reducida y sobre el residuo obtenido se añadió una disolución acuosa 1M de HCl (20 mL) y AcOEt (20 mL). Tras separar las fases, la orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaCl sat., se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto crudo de la reacción se purificó

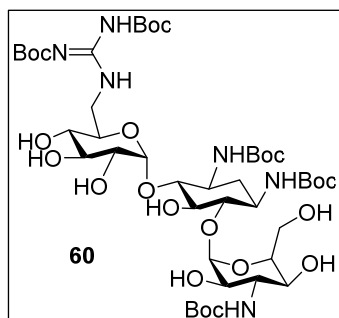
por cromatografía en columna de sílica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 3:1:0,1) obteniéndose el compuesto **59** como un sólido amorfo (0.53 g, 90%).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 7.50-7.33 (m, 5H), 5.20-4.90 (m, 4H), 4.06 (dd, J = 8.5, 4.3 Hz, 1H), 3.87-3.33 (m, 17H), 2.19-1.89 (m, 1H), 1.57-1.30 (m, 28H).

^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 75 MHz) δ : 157.0, 156.8, 155.8, 155.4, 137.6, 134.8, 128.8, 128.3, 128.2, 101.5, 98.2, 84.3, 80.7, 78.3, 78.2, 77.7, 75.5, 73.3, 73.1, 72.5, 70.8, 70.6, 67.8, 66.8, 60.7, 56.3, 50.5, 49.4, 42.3, 35.3, 28.8, 28.7, 28.6.

MS-API-ES: 919 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

3.4.5.3a. 6'-guanidinio (Boc) $_2$ -1,3,3''-(Boc) $_3$ kanamicina A, **60**



Sobre una disolución del compuesto **59** (0.31 g, 0.34 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano/MeOH/ H_2O (2 mL /2 mL /1 mL), se añadió Pd-C al 20% (45 mg, 20% w/w) y AcOH (2 mL). La mezcla se mantuvo bajo atmósfera de hidrogeno a t.a. durante 12 h. Una vez finalizada la reacción el catalizador se eliminó por filtración a través de Celite y el

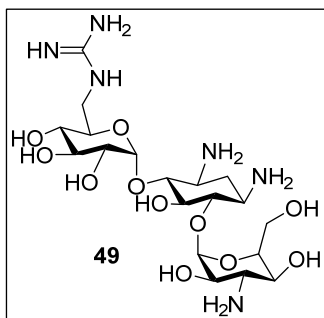
disolvente fue eliminado a presión reducida. Finalmente, el producto crudo de la reacción se filtró sobre sílica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 4:1:0.1) obteniéndose el compuesto 1,3,3''-(Boc) $_3$ kanamicina A. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ : Señales seleccionadas: 4.91, (d, J = 4 Hz, 1H), 4.89 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 1.34 (3s, 27H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) δ : 156.8, 155.8, 155.3, 101.4, 98.3, 84.4, 80.4, 78.3, 77.6, 75.4, 73.5, 73.3, 72.8, 72.7, 71.3, 70.8, 67.8, 60.7, 56.3, 50.4, 49.5, 42.9, 35.1, 28.8, 28.7, 28.6. MS-API-ES: 785 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ El compuesto obtenido (0.2 g, 0.27 mmol) se disolvió en 1,4-dioxano (8 mL) y se añadió GN-Tf (**45**) (0.11 g, 0.29 mmol) y TEA (40 μL , 0.29 mmol) y se dejó agitando a t.a. durante 5 días. Finalizada la reacción el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por columna cromatográfica en sílica gel ($\text{AcOEt} \rightarrow \text{AcOEt}/\text{MeOH}$ 90:10) obteniéndose el compuesto **60** como una espuma blanca (0.18 g, 40%, 2 etapas).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 5.10 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.0 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.50-4.39 (m, 1H), 4.33-4.25 (m, 1H), 4.23-4.12 (m, 1H), 4.06 (td, J = 10.0, 4.0 Hz,

1H), 3.96 (dd, $J = 11.2, 2.9$ Hz, 1H), 3.82 (dt, $J = 11.2, 9.0$ Hz, 1H), 3.75-3.68 (m, 2H), 3.64-3.43 (m, 2H), 3.38 (td, $J = 9.5, 2.9$ Hz, 1H), 3.14 (sq, 2H), 3.05-2.90 (m, 2H), 2.47-2.32 (m, 1H), 1.50-1.07 (m, 46H).

MS-API-ES: 919 (M+H)⁺

3.4.5.4a. 6'-Guanidinio-kanamicina A, **49**



Sobre una disolución del compuesto **60** (0.18 g, 0.21 mmol) en CH₂Cl₂ (2 mL) bajo atmósfera de Ar se añadió TFA (0.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Posteriormente se eliminó el disolvente a presión reducida y se co-evaporó dos veces con tolueno. El residuo obtenido se disolvió en agua destilada, y el sobrenadante se liofilizó para dar la sal de TFA del compuesto **49** como un polvo blanco (51 mg, 33%).

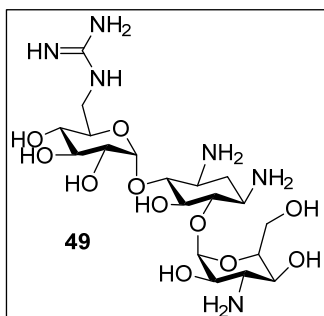
¹H-RMN (D₂O, 400 MHz) δ : 5.38 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 4.96 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.83-3.37 (m, 17H), 3.34 (dd, $J = 10.5, 10.5$ Hz, 1H), 3.24 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H), 2.39 (ddd, $J = 12.3, 4.1, 4.1$ Hz, 1H), 1.76 (ddd, $J = 12.3, 12.6, 12.6$ Hz, 1H).

¹³C RMN (D₂O, 100 MHz) δ : 157.9, 100.7, 97.7, 83.9, 79.0, 73.1, 72.9, 72.3, 71.4, 71.1, 69.7, 68.3, 65.4, 59.9, 55.1, 49.8, 48.1, 41.8, 27.8.

MS-API-ES: 526 (M+H)⁺

Procedimiento 2

3.4.5.1b. 6'-Guanidinio-kanamicina A, **49**



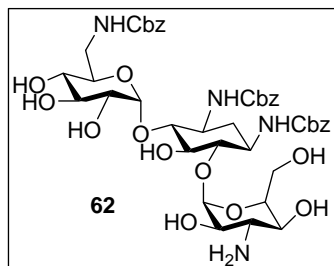
Sobre una disolución de kanamicina A en su forma de base libre (0.1 g, 0.2 mmol) en H₂O (6 mL) se añadió una disolución de GN-Pir (**61**) (62 mg, 0.2 mmol) en 1,4-dioxano (4 mL) y DIPEA (38 μ L, 0.22 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. durante 5 h. tras las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purificó por columna cromatográfica en sílica gel (NH₄OH:BuOH:EtOH:tolueno, 4:3:5:3) obteniéndose 6'-(Boc)₂-guanidinio-kanamicina A como una espuma blanca

(0.113 g, 78%). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 5.21 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.03 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 3.86 (dt, $J = 8.5, 3.6$ Hz, 1H), 3.74-3.62 (m, 2H), 3.61-3.46 (m, 4H), 3.45-3.23 (m, 7H), 3.23-3.21 (m, 1H), 3.19 (q, $J = 1.9$ Hz, 1H), 3.13 (dt, $J = 6.0, 3.2$ Hz, 1H), 2.43 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 1.76 (sq, $J = 12.8$ Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 173.6, 156.4 (2C), 99.4, 99.0, 83.8 (2C), 83.6 (2C), 79.0 (2C), 73.4, 72.8 (2C), 72.4, 71.2, 69.1, 65.9, 56.3, 51.6, 49.9, 48.1, 35.3, 28.3 (6C). MS-API-ES: 727 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. Finalmente, sobre una suspensión de este compuesto (0.18 g, 0.21 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) bajo atmósfera de Ar se añadió TFA (0.5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Posteriormente se eliminó el disolvente a presión reducida y se co-evaporó dos veces con tolueno. El residuo obtenido se disolvió en agua destilada, y el sobrenadante se liofilizó para dar la sal de TFA del compuesto **49** como un polvo blanco (0.145 g, 95%).

La caracterización por métodos espectroscópicos de este compuesto esta descrito en el procedimiento anterior.

3.4.6. Síntesis de 3''-Guanidino-kanamicina A, 50

3.4.6.1. 1,3,6'- (Cbz)₃-kanamicina A, 62

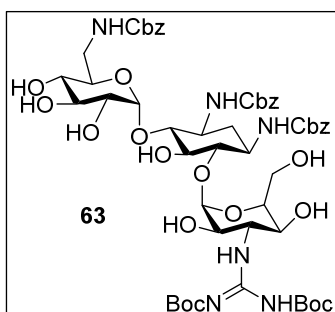


Sobre disolución del compuesto **52** (1 g, 0.98 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano/ H_2O (100 mL/30mL), se añadió una disolución acuosa 1.5 M de NaOH (30 mL). La mezcla se agitó a 4 °C durante 24h, controlando el avance de la reacción por CCF ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 4: 3: 1). Cuando se observó la desaparición del producto de partida se añadió una disolución acuosa 1M de HCl para ajustar el pH a 2. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida se adiciono una mezcla de hielo y H_2O , lo que dio lugar a la aparición de un precipitado. Este se eliminó por filtración y al filtrado se le añadió una disolución acuosa 1M de NaOH para ajustar el pH a 9, observándose de nuevo la formación de un precipitado. Tras la filtración el sólido se purificó por columna cromatográfica en gel de sílica ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 12:2:0.2 \rightarrow $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 5:2:0.2) obteniéndose el compuesto **62** como un sólido blanco (0.54 g, 63%, conversión: 80%).

^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz) δ : 7.89 (s, 1H), 7.33-7.30 (m, 17H), 6.85 (br s, 1H), 5.56 (br s, 1H), 5.41 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.37 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 5.09-4.85 (m, 9H), 4.35 (s, 1H), 3.81 (s, 2H), 3.56-3.15 (m, 6H), 3.07 (br s, 1H), 1.70 (br s, 1H), 1.49-1.37 (m, 1H).

MS-API-ES: 913 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

3.4.6.2.-1,3,6'- (Cbz) $_3$ -3''-guanidino(Boc) $_2$ kanamicina A, **63**

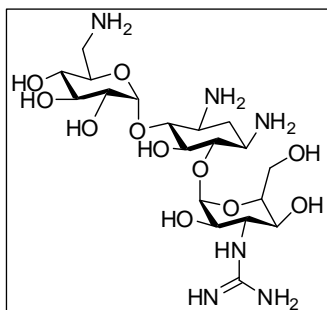


Sobre una disolución del compuesto **62** (0.235 g, 0.266 mmol) en 1,4-dioxano (13.5 mL) se añadió GN-Tf (**45**) (0.156 g, 0.399 mmol) y TEA (0.11 mL, 0.8 mmol), la mezcla de reacción se dejó agitando a t.a. durante 5 días. Luego se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica gel ($\text{AcOEt} \rightarrow \text{AcOEt}/\text{MeOH}$ 90:10) para dar el compuesto **63** (0.216 g, 72%) como una espuma blanca.

^1H RMN ($\text{MeOD}-d_4$, 300 MHz) δ : 7.41-7.23 (m, 15H), 5.20 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.14-4.97 (m, 12H), 4.95 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.09 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 3.84-3.54 (m, 12H), 3.52 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 3.50-3.38 (m, 7H), 2.07 (ddd, $J = 12.9, 12.6, 12.6$ Hz, 1H), 1.47 (m, 9H).

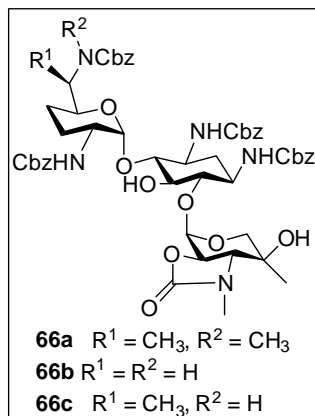
MS-API-ES: 1129 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

3.4.6.3.- 3''-guanidino-kanamicina A, **50**



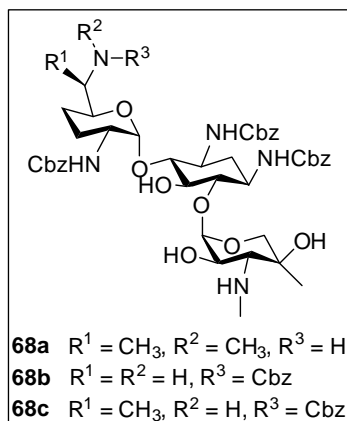
Sobre una disolución del compuesto **63** (0.216 g, 0.192 mmol) en MeOH (3.8 mL) se añadió Pd-C al 20% (43 mg, 20% w/w) y AcOH (1.1 mL). La mezcla de reacción se dejó agitando bajo atmósfera de hidrógeno durante 24 h., tras la cual se filtró sobre de Celita, se lavó con MeOH y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo crudo se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. MS-API-ES: 729 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ (**64a**) y 626($\text{M}+\text{H}$) $^+$ (**64b**). El crudo de la etapa anterior se disolvió en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (2.9 mL, 4:1 v/v). La mezcla se agitó a t.a. durante 5 h., se eliminó el

3.4.7.2.- 1,3,2',6',-(Cbz)₅-2'',3''-uretano-gentamicina C1, 1,3,2',6',-(Cbz)₅-2'',3''-uretano-gentamicina C1a y 1,3,2',6',-(Cbz)₅-2'',3''-uretano-gentamicina C2, **66a**, **66b** y **66c**



Sobre una disolución de la mezcla **65a-c** (0.3 g, 0.32 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano/H₂O (30 mL/10 mL), se añadió una disolución acuosa 2.5 M de NaOH (10 mL). La mezcla resultante se agitó durante 24 horas a 50 °C, tras las cuales se añadió una disolución acuosa de HCl 1 M para ajustar el pH a 10. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida se añadió H₂O. El sólido resultante se filtró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CHCl₃/MeOH/NH₄OH, 8:2:0.2 → 6:3:1) obteniéndose la mezcla **66a-c** como un sólido blanco (0.29 g, 90%). MS-API-ES: 1040 (M+H)⁺ (**66a**), 1026 (M+H)⁺ (**66b**), 1012 (M+H)⁺ (**66c**).

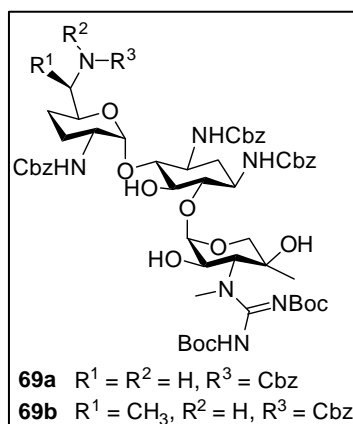
3.4.7.3.- 1,3,2'-(Cbz)₃-gentamicina C1, 1,3,2',6'-(Cbz)₄-gentamicina C1a y 1,3,2',6'-(Cbz)₄-gentamicina C2, **68a**, **68b** y **68c**



Sobre una disolución de gentamicina C1, C1a y C2 en su forma de base libre (0.3 g, 0.64 mmol) en DMSO (4 mL) a 0 °C se añadió N-benciloxi-carbonil succinimida (Suc-Cbz, **67**) (0.52 g, 2.11 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente durante 2 h. a temperatura ambiente, tras las cuales se añadió Et₂O (100 mL), observándose la formación de un aceite incoloro en el fondo del matriz.

Tras la decantación del disolvente este aceite se lavó con Et₂O (2 x 5 mL) y se añadió sobre una columna de resina Amberlita™ IRA-120-H⁺ (5 g.). Tras la elución con una mezcla de 1,4-dioxano/H₂O (1:1) para separar la N-hidroxi-succinimida sobrante la resina se lavó con una disolución 0.5M de NH₃ en 1,4-dioxano/H₂O (1:1) obteniendo la mezcla de compuestos **68b** y **68c** (0.17 g, 37%) como un sólido blanco. MS-API-ES: 985 (M+H)⁺ (**68b**), 1000 (M+H)⁺ (**68c**). Cuando la resina se lavó con una disolución 1M de NH₃ en 1,4-dioxano/H₂O (1:1) se obtuvo el derivado **68a** (73 mg, 13%) como un sólido blanco. MS-API-ES: 880 (M+H)⁺ (**68a**).

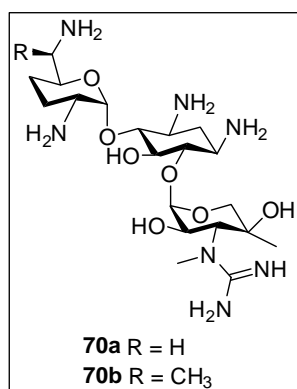
3.4.7.4.- 1,3,2',6'-(Cbz)₄-3''-(Boc)₂-guanidinio-gentamicina *C1a* y 1,3,2',6'-(Cbz)₄-3''-(Boc)₂-guanidinio-gentamicina *C2*, **69a** y **69b**.



Sobre una disolución de la mezcla de compuestos **68b** y **68c** (0.17 g, 0.23 mmol) en 1,4-dioxano (11.7 mL) se añadió GN-Tf (**45**) (0.134 g, 0.34 mmol) y TEA (95 µL, 0.69 mmol), la mezcla de reacción se dejó agitando a t.a. durante 5 días. Luego se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna de sílica gel (AcOEt → AcOEt/MeOH 90:10) para dar la mezcla **69a** y **69b**

(0.20 g, 72%) como una espuma blanca. MS-API-ES: 1228 (M+H)⁺ (**69a**), 1244 (M+H)⁺ (**69b**).

3.4.7.5.- 3''-guanidinio-gentamicina *C1a* y 3''-guanidinio-gentamicina *C2*, **70a** y **70b**



Sobre una disolución de la mezcla **69a** y **69b** (0.20 g, 0.165 mmol) en MeOH (3.2 mL) se añadió Pd-C al 20% (37 mg, 20% w/w) y AcOH (1.0 mL). La mezcla de reacción se dejó agitando bajo atmósfera de hidrogeno durante 24 h., tras la cual se filtró sobre de Celita, se lavó con MeOH y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo crudo se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. La mezcla se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂/TFA (2.5 mL, 4:1 v/v). La

mezcla se agitó a t.a durante 5 h., se eliminó el disolvente a presión reducida y se co-evaporó dos veces con tolueno. El crudo obtenido se disolvió en agua destilada, y el sobrenadante se liofilizó para dar la mezcla **70a** y **70b** como un polvo blanco con su sal de TFA correspondiente (67 mg, 82% dos etapas).

Átomo	70a	70b
1'	5.05 (d, <i>J</i> = 3.9 Hz)	5.05 (d, <i>J</i> = 3.9 Hz)
2'	3.47 – 3.24 (m)	3.47 – 3.24 (m)
3a'/3b'	1.68-1.48 (m)	1.68-1.48 (m)
4a'/4b'	1.68-1.48 (m)	1.68-1.48 (m)

5'	3.83 – 3.79 (m)	3.83 – 3.79 (m)
6a'/6b'	2.82 – 2.72 (m)	2.82 – 2.72 (m)
1	3.16 (t, $J = 5.0$ Hz)	3.16 (t, $J = 5.0$ Hz)
2a/2b	2.52 – 2.21 (m)	2.52 – 2.21 (m)
	1.48 – 1.39 (m)	1.48 – 1.39 (m)
3	3.02 (t, $J = 5.8$ Hz)	3.02 (t, $J = 5.8$ Hz)
4	3.47 – 3.24 (m)	3.47 – 3.24 (m)
5	3.79 – 3.61 (m)	3.79 – 3.61 (m)
6	3.47 – 3.24 (m)	3.47 – 3.24 (m)
1''	5.19 (d, $J = 3.6$ Hz)	5.18 (d, $J = 3.5$ Hz)
2''	3.79 – 3.61 (m)	3.79 – 3.61 (m)
3''	2.82 – 2.72 (m)	2.82 – 2.72 (m)
5a''/5b''	3.79 – 3.61 (m)	3.79 – 3.61 (m)
-N-CH ₃	2.78 (s)	2.68 (s)
-CH ₃ (4'')	1.19 (d, $J = 6.8$ Hz)	1.16 (d, $J = 6.9$ Hz)

MS-API-ES: 492 (M+H)⁺ (**70a**), 506 (M+H)⁺ (**70b**).

3.4.8. Medios de cultivo y soluciones.

3.4.8.1. Medio Luria Bertani (LB).

Para la preparación de este medio de cultivo inicialmente se prepara una disolución de Bacto Triptona (10.0 g), Extracto de levadura (5.0 g) y NaCl (10.0 g) en 1 litro de agua destilada. Posteriormente se ajusta a pH 7 con NaOH y se esteriliza mediante autoclave durante 20 min a 121 °C. Una vez esterilizado, cuando el medio se encuentra a 50 °C se adiciona una disolución o de ampicilina estéril (250 mg/mL) o de kanamicina estéril (26 mg/mL) a razón de 1mL/L de cultivo.¹⁷⁵ Para la preparación de medio sólido en placas se añade además agar 20 g/L de medio de cultivo antes de la esterilización.

3.4.8.2. Medio Mueller-Hinton (MH).

Para la preparación de este medio se disuelve medio Caldo de Mueller Hinton (21.0 g) en (1 L) de agua destilada. La mezcla se calienta bien bajo agitación continua y se lleva a ebullición durante 1 min. Posteriormente se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min.

3.4.9. Procedimiento para la Determinación de CIM (concentración inhibitoria mínima).

Las cepas utilizadas para este estudio se inocularon en (5 mL) de medio Mueller-Hinton y se dejaron en agitación a 37 °C durante 24 h para su crecimiento. Transcurrido este tiempo, se tomó un 1% de estos cultivos y se transfirieron a 5 mL de medio Muller-Hinton y se dejó nuevamente en agitación a 37 °C durante 24 h., tras las cuales se volvió a repetir el procedimiento anterior. Esta operación se realizó a lo largo de 4 días. El quinto día se inoculó un 1% de la cepa *E. coli* BL21(DE3) en (1 mL) de Muller-Hinton, y se creció en agitación a 37 °C hasta una D.O._{600 nm} ~ 0.5 UA., momento en el que se adicionó una concentración de antibiótico entre (0.5-400 µg/mL). Después de incubar durante aproximadamente 24 h. a 37 °C, se registró la D.O._{600 nm} de cada uno de los medio para determinar la concentración inhibitoria Mínima (CIM) de los antibióticos en diferentes cepas.

3.4.10. Actividad Enzimática.

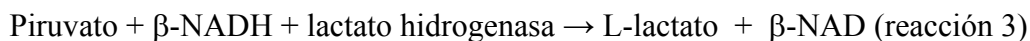
3.4.10.1. Actividad enzimática de la enzima ANT(4') de *S. aureus* mediante ensayos de HPLC.

La determinación de actividad se hizo por HPLC equipado con una columna de intercambio iónico Vydac 30/I. Como fase móvil fue utilizada una disolución acuosa de TFA a pH 3.0, un flujo de 1.0 mL·min⁻¹ y una longitud de onda de 260 nm. Las muestras a concentraciones variables de kanamicina A y de los antibióticos semi-sintéticos **47-50** (0.03-3 mM) se prepararon en una disolución acuosa que contenía NaH₂PO₄ (20 mM) (pH~7.5), MgCl₂ (5 mM), ATP (3 mM). La reacción se inició mediante la adición de una concentración 0.5 µM del enzima ANT(4') clonado y expresado anteriormente en nuestro laboratorio.^{155a} La formación del producto de reacción fue confirmado por espectrometría de masas de las mezclas de reacción finales,

observándose la aparición de los picos moleculares correspondientes a cada uno de los antibióticos estudiados adenilados. MS-API-ES (**AMP-Kan A**): 814.7 [M+H]⁺; MS-API-ES (**AMP-47**): 897.3 [M+H]⁺; MS-API-ES (**AMP-48**): 897.3 [M+H]⁺; MS-API-ES (**AMP-49**): 856.7 [M+H]⁺; MS-API-ES (**AMP-50**): 856.7 [M+H]⁺.

3.4.10.2. Actividad enzimática de la enzima APH-3'-IIa de *E coli* mediante ensayo espectrofotométrico.

La fosforilación de los antibióticos se determinó mediante el acomplamiento a la formación de ADP de la reacción de fosforilación catalizada por el enzima APH(3') (reacción 1) del ensayo enzimático piruvato quinasa (reacción 2) / lactato deshidrogenasa (reacción 3), controlando la oxidación del β -NADH mediante la medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm y considerando el coeficiente de extinción del β -NAD, $\varepsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



Las condiciones del ensayo para 1 mL fueron: tampón HEPES (50 mM) (pH~7.7), KCl (40 mM), MgCl₂ (10 mM), NADH (247 mM), fosfoenolpiruvato (2.5 mM), ATP (1 mM), diversas concentraciones de aminoglicósidos (de 5 mM a 1.25 mM de aminoglicósido para la kan-A y para **47-49** y de 62.5 mM a 1.25 mM para el compuesto **50**), 5 Unidades de quinasa piruvato / lactato deshidrogenasa y 10 unidades de APH (3')-Ib.

Inicialmente las mezclas sin el enzima APH(3') se pre-incubaron a 37 °C durante 5 min. y las reacciones se iniciaron mediante la adición de 10 μ l de la proteína parcialmente purificada. Los controles negativos se prepararon omitiendo los aminoglicósidos en la mezcla, obteniendo el valor de fosforilación del antibiótico mediante la diferencia entre la mezcla de reacción y los controles negativos respectivamente.

3.4.10.3 Actividad enzimática de la enzima AAC6'-Ib mediante ensayo espectrofotométrico.

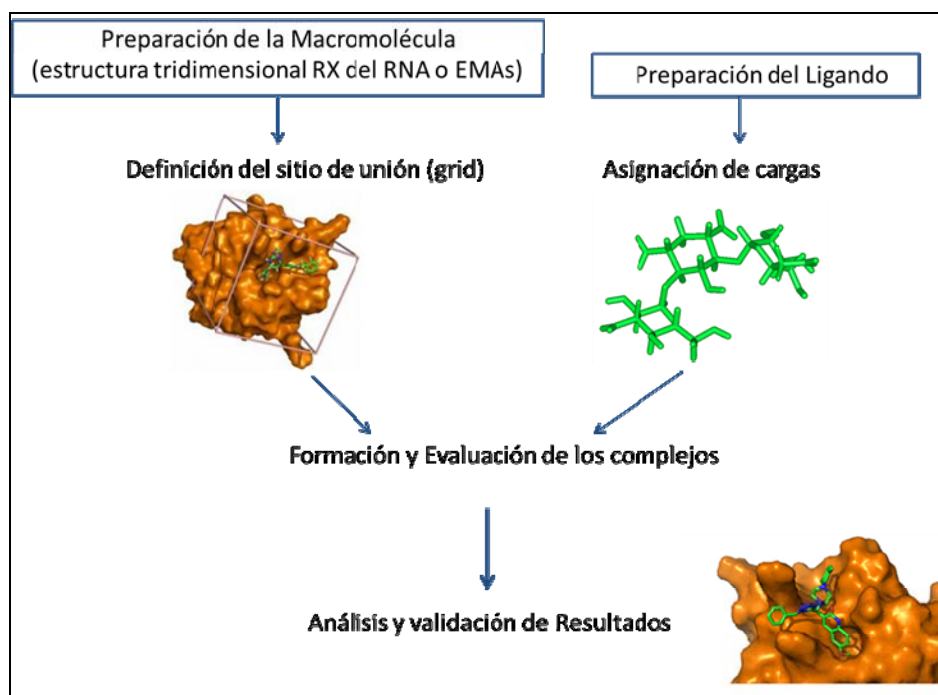
Las reacciones de acetilación de la kan-A y de **47-50** fueron controladas por la actividad de la enzima AAC(6')-Ib utilizando un ensayo espectrofotométrico descrito previamente en la bibliografía.^{166c}. Las condiciones del ensayo para 500 µL de reacción utilizadas fueron: tampón Tris (50 mM) (pH~7.6), DTDP (2 mM), acetyl-CoA (40 µM), EDTA (1 mM) y enzima AAC(6')-Ib (volúmenes de 10 µL de una disolución de enzima 5 µM). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de concentraciones variables de kan-A y **47-50** (0.1 mM - 1 mM). Las reacciones se incubaron a 37 °C y se monitorizó la producción CoASH tomando lecturas a 324 nm cada 30 s. durante 30 min.

3.4.10.4. Estudios de T_m de las proteínas con y sin ligandos mediante determinación del desplazamiento térmico de las proteínas.

Este ensayo se llevó a cabo en un sistema de PCR a tiempo real iQ5 (Bio-Rad, CA) utilizando como colorante Sypro 5+. Las condiciones del ensayo para 100 µL fueron: tampón Tris (90 µL de una disolución 10 mM) (pH~8.0), NaCl (0.2 mM), Sypro Orange (2.8 mM) y las enzimas (ANT(4'), APH(3')-IIa y AAC(6')-Ib todas a una concentración 4.4 µM. Los aminoglicósidos kan-A y los derivados **44** y **47-50** se adicionaron a una concentración de 10 mM. Finalmente, las muestras se calentaron en un rango de temperaturas entre 25 y 70 °C con una velocidad de calentamiento de 0.5 °C / min. La intensidad de la fluorescencia se midió con Ex / Em 490/530.

3.4.11. Estudios computacionales para la determinación de la unión aminoglicósidos con su diana biológica (ARNr) y con las enzimas de resistencia utilizando los programas AutoDock y Maestro.

Aunque los estudios computacionales se han llevado a cabo utilizando dos programas diferentes, sin embargo los pasos para realizarlos en ambos casos son similares, tal como se muestra en la figura 3.20: (a) preparación de la macromolécula y definición del sitio de unión (grid) y preparación del ligando con la correspondiente asignación de cargas; (b) formación de los complejos y evaluación de los mismos y (c) análisis y validación de los resultados obtenidos.

Figura 3.20. Metodología general del docking.

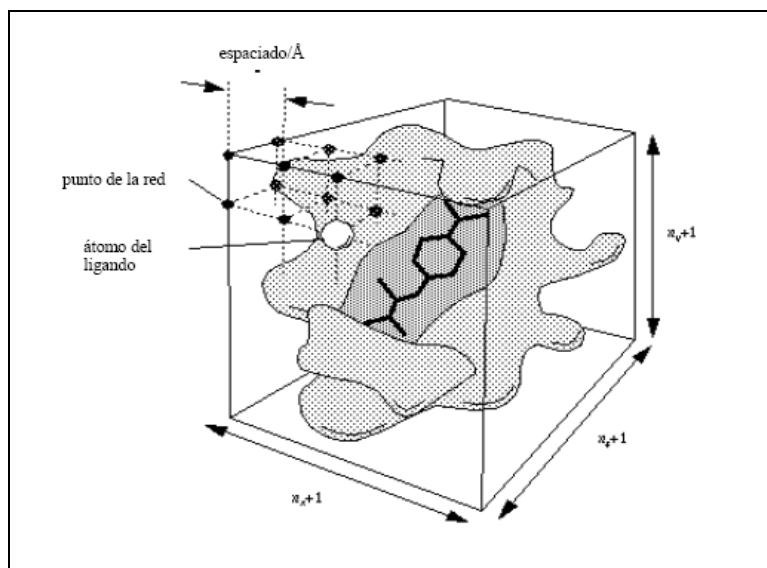
3.4.11.1. Programa Autodock 4.2.

Los cálculos de modelización molecular se realizaron con el programa Autodock 4.2.¹⁷⁶ La preparación de los archivos de entrada y el análisis de los resultados se llevó a cabo con la interfaz gráfica del programa, Autodock Tools. Los ligandos se minimizaron con ChemDraw 3D Pro 13.0. Las estructuras cristalográficas de los receptores se obtuvieron a partir de la base de datos PDB. Para el caso del ARNr fue la 2esi, para la ANT(4') la 1kny, para la APH(3') la 1nd4 y por último para la AAC(6') fue la 2bue. El primer paso en la preparación de los archivos de entrada de Autodock 4.2 consiste en la adición de los hidrógenos (sólo los polares para la proteína), las cargas y los parámetros de solvatación tanto al ligando y como a la macromolécula. Las cargas de la proteína se adicionaron inicialmente con ADT y posteriormente se adicionaron las cargas de Kollman. Los archivos de coordenadas del ligando y de la macromolécula así preparados fueron guardados con las extensiones *pd bq* y *pd bqs*, para el ligando y la macromolécula respectivamente. En el caso del ligando el archivo *.pd bq* lleva, además de la introducida anteriormente en su preparación información acerca de las torsiones del ligando que van a poder girar libremente durante el cálculo. Esta información no se encuentra en el caso del archivo de la macromolécula ya que éstas se mantienen fijas durante el cálculo. Sin embargo, en este trabajo esta información no fue empleada ya

que el cálculo se llevó a cabo sin flexibilidad en las torsiones del ligando para la búsqueda global de los posibles sitios de unión.

Una vez estos archivos fueron preparados éstos (.pdbq y .pdbqs) fueron empleados en primer lugar para calcular un mapa de energía potencial y electrostática para cada tipo de átomo del ligando (*grid map*). Los mapas describen una caja tridimensional, centrada en algún punto de interés del receptor, que está formada por una red de puntos separados una distancia constante (espaciado de la red, *grid spacing*). La magnitud del espaciado de la red varía entre 0,2 y 1 Å y cada punto de la caja contiene la información de la energía resultante de la interacción de un átomo del ligando, situado en esa posición, con todos los átomos del receptor. En el ajuste, la posición de la proteína se mantiene fija, mientras que el ligando se va moviendo (figura 3.21), en este caso toda la proteína está dentro de la caja. El espaciado de la red es el mismo en las tres dimensiones.

Figura 3.21. Representación del mapa de energías para un receptor.



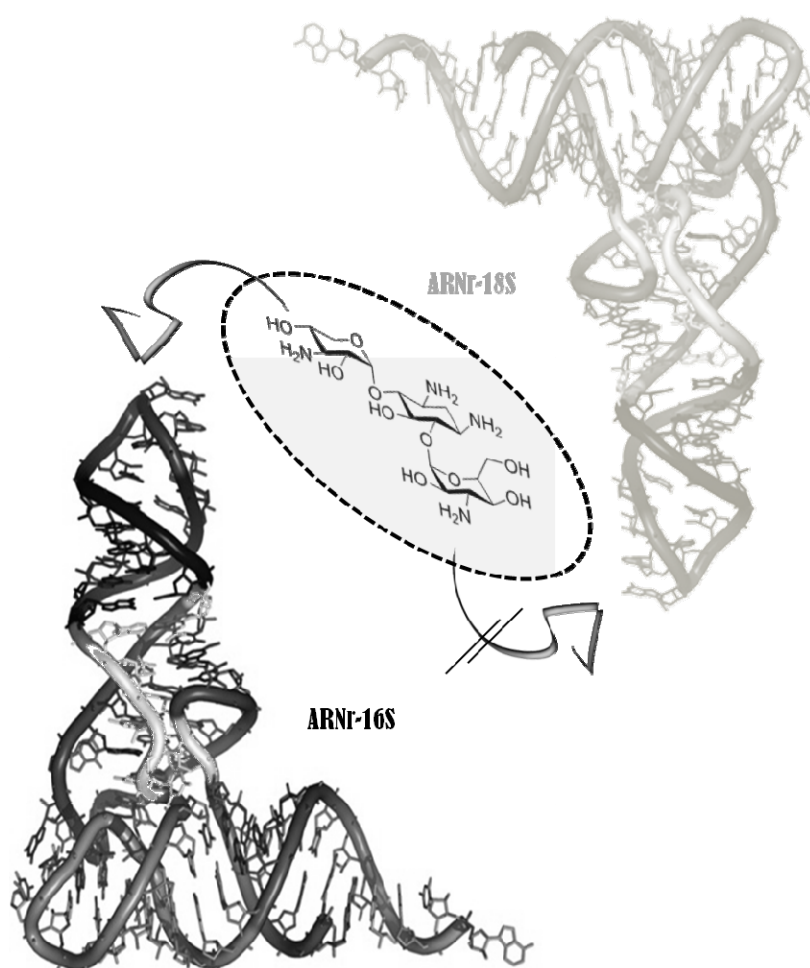
Los mapas de energía se calculan con el programa AutoGrid incorporado en el paquete informático AutoDock 4.2. AutoGrid requiere un archivo (con extensión *gpf* generado con ADT) que especifica los parámetros del cálculo: tamaño de la caja, localización del centro, espaciado de la red y constante dieléctrica. En este trabajo, para las búsquedas globales de los posibles sitios de unión los espaciados de red empleados son 0.375 Å y se define la caja encerrando toda la proteína. El centro para los cálculos con la estructura obtenida por rayos X se localizó entre los residuos catalíticos (glu145,

76, 141, 67, lys-149, 74, thr-187, ser-39, 49, 94, para el caso de la ANT(4')). Los mapas de energía calculados junto con los archivos .pdbq y .pdbqs constituyen los archivos de entrada de Autodock 4.2. Al igual que con Auto Grid es necesario generar un archivo que lleve la información de las condiciones del cálculo, en este caso tiene extensión .dpf. El método de ajuste que vamos a utilizar está basado en los Algoritmos Genéticos Lamarkianos (AGL). El método AGL permite analizar variaciones de la posición, orientación y conformación del ligando en la búsqueda de posibles sitios de unión a la proteína. Los parámetros utilizados se denominan "variables de estado" y, por analogía con la terminología genética, se han denominado genotipo del ligando. Las coordenadas que resultan del ajuste (*docking*) del ligando en el sitio de unión de la proteína y sus energías intramoleculares correspondientes serían el análogo del fenotipo. Cada ciclo de ajuste tiene una etapa de cruzamiento, una de mutación, una minimización energética y una etapa de selección. Inicialmente, el programa genera, de manera aleatoria, una población de estructuras del ligando en la que el número de individuos es elegido por el usuario. A continuación se produce el cruzamiento al azar de parejas de individuos, intercambiando dos de sus variables de estado. Las nuevas estructuras generadas reemplazan a las originales, de modo que el número total de individuos se mantiene constante. Posteriormente, se generan, de nuevo de modo aleatorio, mutaciones en las variables de estado y se realiza una minimización energética local, de tipo Solís y Wets. Las estructuras optimizadas reemplazan a las originales y, de este modo, las mejoras conseguidas con la minimización (que en este caso reflejan la adaptación del fenotipo al entorno, en términos evolutivos) se transmiten a las nuevas generaciones de individuos. Por ello, se denominan algoritmos lamarkianos. Las mejores estructuras así obtenidas se seleccionan para pasar al siguiente ciclo de ajuste. Mediante la concatenación de varios de estos ciclos (cruzamiento-mutación-minimización-selección) se genera una estructura que constituye un posible modo de unión en las condiciones del cálculo. El número de ciclos empleados para generar cada estructura se puede variar, cambiando el número de evaluaciones energéticas. El proceso global se repite varias veces para generar distintos modos de unión (10 o 100). Las soluciones se agrupan de acuerdo con la desviación cuadrática media (RMSD) de unas con respecto a las otras. En los cálculos realizados en este trabajo, el tamaño de la población de estructuras generada es de 200 individuos y el número máximo de evaluaciones energéticas para los ciclos de cruzamiento-mutación-minimización-selección es de 3×10^6 . El proceso global se repite 100 veces, generando

100 posibles modos de unión. Las coordenadas de las estructuras del ligando generadas vienen dadas en un archivo .dlg que se puede visualizar con ADT.

3.4.11.2. *Interfase Maestro de Schrödinger*

Los receptores se prepararon utilizando Wizard. La conformación inicial de los aminoglicosidos se tomaron de la estructura cristalina del antibiótico unido al ARN o a las EMAs. Los compuestos AMPPNP o AcCoA así como los iones de magnesio del complejo ternario aminoglicósido-ARN se mantuvieron durante el docking. Posteriormente, se preparó el ligando usando LigPrep mediante la modificación de las torsiones del ligando y la asignación de sus estados de protonación apropiadas. Se generaron 32 estructuras estereoquímicas por compuesto de estados posibles a pH 7,0 \pm 2,0, tautomerizado y optimizado mediante la producción de baja energía estructuras 3D para el ligando de acuerdo con el campo de fuerza OPLS 2005 conservando las quiralidades especificadas de la entrada para un archivo Maestro. La red del receptor se preparó usando Grid. Las redes se han generado manteniendo los parámetros por defecto del factor van der Waals de escala de corte de 1,00 y 0,25 sometido a la fuerza de campo OPLS 2001. Una caja cúbica de dimensiones específicas (15 Å x 15 Å x 15 Å) centrada en el aminoglicósido se ha generado para el receptor. Posteriormente se llevó a cabo el docking con el programa Glide con minimización posterior de las mejores estructuras en la interfase Schrödinger-Maestro v9.2.7. Se usó en la mayoría de los casos el procedimiento estándar (SP).



Capítulo 4

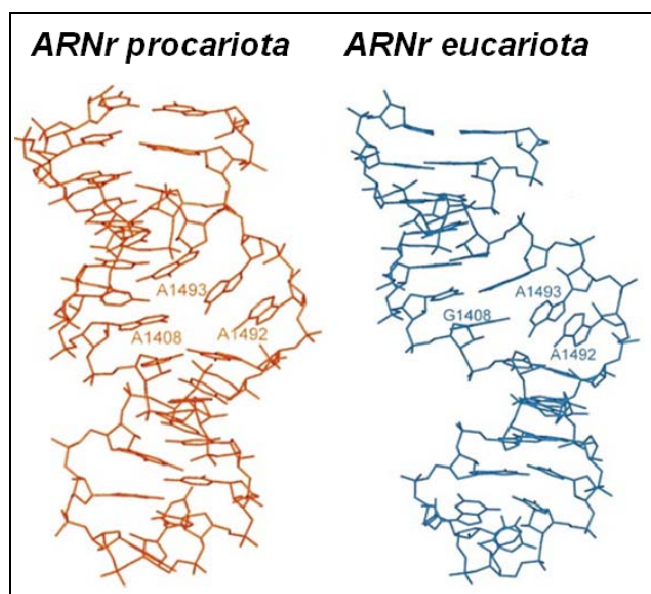
**Un nuevo 4,6-aminoglicósido para
su unión selectiva al sitio 16S
ARNr procariota.**

4.1. Introducción

Como ya se ha comentado en el capítulo 1 de esta Memoria, los aminoglicósidos ejercen su acción a través de la unión al ARN de la subunidad menor del ribosoma procariota (30S), siendo antibióticos de amplio espectro muy potentes. Sin embargo, la eficacia de estos compuestos en clínica se encuentra limitada en gran medida por su elevada toxicidad, en particular oto- y nefrotoxicidad.^{52, 149b, 177}

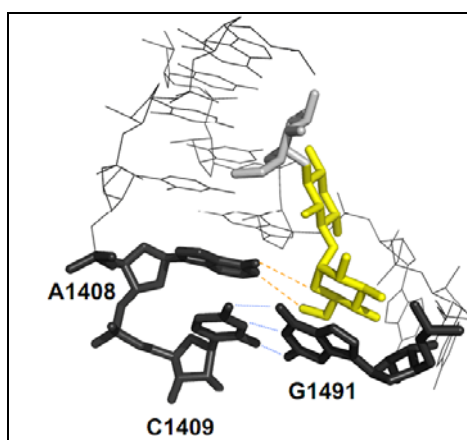
Entre los factores recientemente implicados en la toxicidad de estos compuestos se encuentra la unión de los aminoglicósidos no sólo al sitio A del ARN procariota (16S) sino también al sitio A del ARN citoplasmático eucariota (18S). Estudios recientes han demostrado que este hecho es debido a la similitud existente entre ambos ARNs, tal como se muestra en la figura 4.1.¹⁷⁸ En ella puede observarse que la diferencia fundamental entre ambos centros de reconocimiento es la presencia de una adenina (A1408) en el ARN procariota, en lugar de la guanidina (G1408) del ARN eucariota. Aunque se trata de una variación estructural que podría resultar insignificante, sin embargo resulta clave en lo que a actividad antibiótica se refiere, y la ausencia de esta base hace que la unión del antibiótico al ARN eucariota presente una menor afinidad. De hecho, estudios recientes de mutagénesis han demostrado que la sustitución de la A1408 por otra base da lugar a una disminución considerable de la susceptibilidad de la diana por estos compuestos.¹⁷⁷

Figura 4.1. Similitud entre el ARN eucariota y procariota



A nivel molecular, la mayor susceptibilidad del ARN procariota frente al ARN eucariota por este tipo de antibióticos (tanto 4,5- como 4,6-disustituidos) tienen su origen en el papel fundamental que juega el anillo I (α -2,6-amino-2,6-desoxi-glucopiranososa o α -6-amino-6-desoxi-glucopiranososa), en la interacción con la G1491 y la A1408, que resultan claves en la actividad antibiótica (figura 4.2). En el caso del ARN eucariota la presencia de la G1408 en lugar de la A1408 hace que esta interacción sea menor.¹⁷⁹

Figura 4.2. Interacciones entre el anillo I del aminoglicósido y el ARNr procariota



Por este motivo el diseño y síntesis de nuevos aminoglicósidos que presenten diferencias en su unión al ARN procariota frente al eucariota puede ser una estrategia para la obtención de nuevos antibióticos con menor toxicidad y con ello mayor aplicabilidad en el ámbito clínico.

4.2. Antecedentes y objetivos

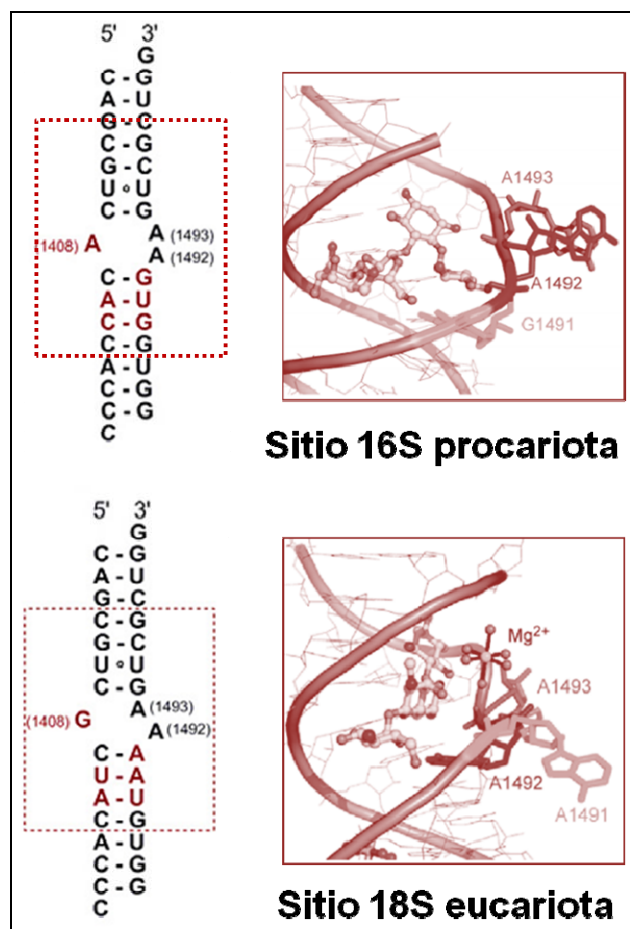
4.2.1. Antecedentes

La determinación a mediados de la pasada década de la estructura cristalográfica de los antibióticos aminoglicósidos en complejo tanto con el ARN procariota^{65a, 70} como eucariota^{138b, 180} ha abierto la puerta al diseño racional de nuevos antibióticos de tipo aminoglicósido con menos toxicidad.¹⁸¹

Gracias a la existencia de estas estructuras de rayos X se ha podido conocer el sitio de unión de los aminoglicósidos tanto al ARNr procariota 16S como al ARNr eucariota citoplasmático 18S (figura 4.3).

En ambos casos los aminoglicósidos se unen a un loop interno que en el caso del ARNr procariota está constituido por adeninas (A1408 en una cadena, y las A1492, A1493 en la otra cadena), mientras que en el eucariota, y tal como se ha comentado anteriormente, la A1408 se encuentra sustituida por una G1408. En lo que respecta a las A1492 y A1493 ambas se conservan en las dos estructuras. El sitio de unión al ARNr procariota se encuentra delimitado por dos pares de bases C-G, mientras que en el ARNr eucariota los pares que lo delimitan son un C-G y un C-A (figura 4.3).

Figura 4.3. Sitio de unión de los aminoglicósidos al ARN procariota y eucariota

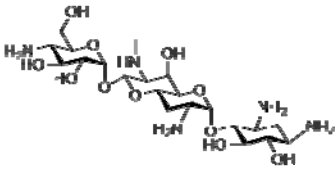
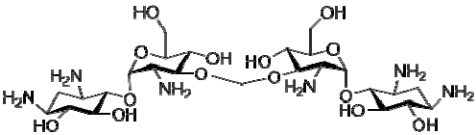
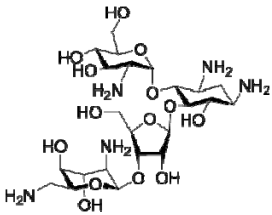
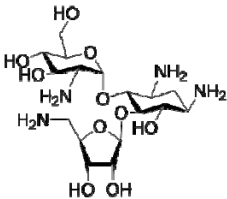


En el sitio de unión del ARNr 16S procariota se han identificado varias interacciones importantes con el aminoglicósido, principalmente con los anillos I y II. El anillo I del antibiótico se apila sobre el residuo G1491 y presenta interacciones con el residuo A1408 de tipo Watson-Crick. Por su parte, el anillo II interacciona con cuatro bases distintas del ARN. Así, el amino de la posición 1 interacciona con el oxígeno de la posición 4 del residuo U1495 y el amino de la posición 3 con las posiciones 2 y 7 del residuo G1494 y con la posición 1 A1493. Estas interacciones resultan claves, siendo

las responsables de mantener el sitio A en forma activa desplazando las dos adeninas (1492 y 1493) hacia el exterior.

En cuanto al sitio de unión del aminoglicósido al ARNr 18S eucariota, aunque el número de estructuras cristalográficas descritas se reduce a las recogidas en la tabla 4.1., a partir de las mismas ha sido posible identificar las interacciones fundamentales en la unión del aminoglicósido al ARNr 18S.

Tabla 4.1. Estructuras cristalográficas de ARN eucariota y sus complejos con aminoglicósidos

Aminoglicósido	PDB	Referencia
 Apramicina 71	4AQY 2OE8 2G5K	138b, 180b, 180c
 Paromomicina 72	2O3V	180a
 Paromomicina 72	2O3W	180a
 Paromomicina 72	2O3Y	180a

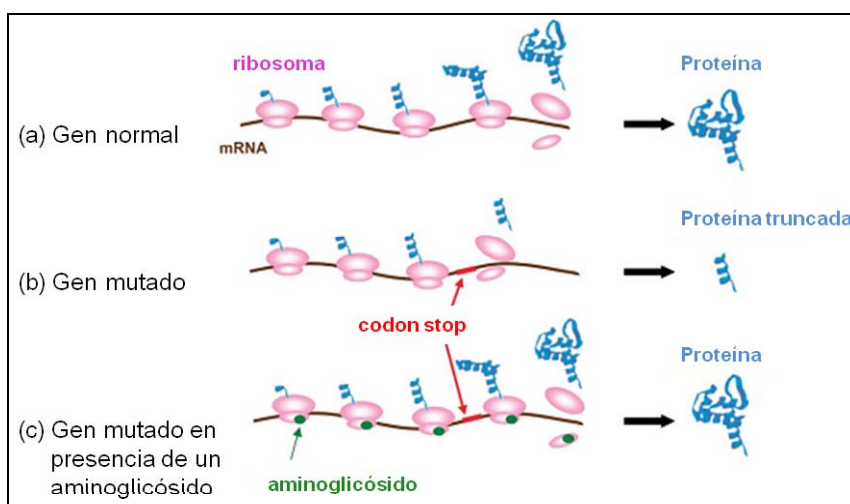
Así, en el ARNr eucariota se han identificado dos interacciones del anillo I con la base G1408 y varias interacciones entre el anillo II y los pares de bases C1404-G1497, G1405-C1496 y C1407-G1494. Estas interacciones, y a diferencia de lo que ocurre en el caso del ARNr procariota, únicamente desplazan hacia afuera el residuo

A1492, permaneciendo el A1493 hacia el interior del loop, siendo la diferencia clave en el resultado de la unión de los aminoglicósidos a ambos ARNr.

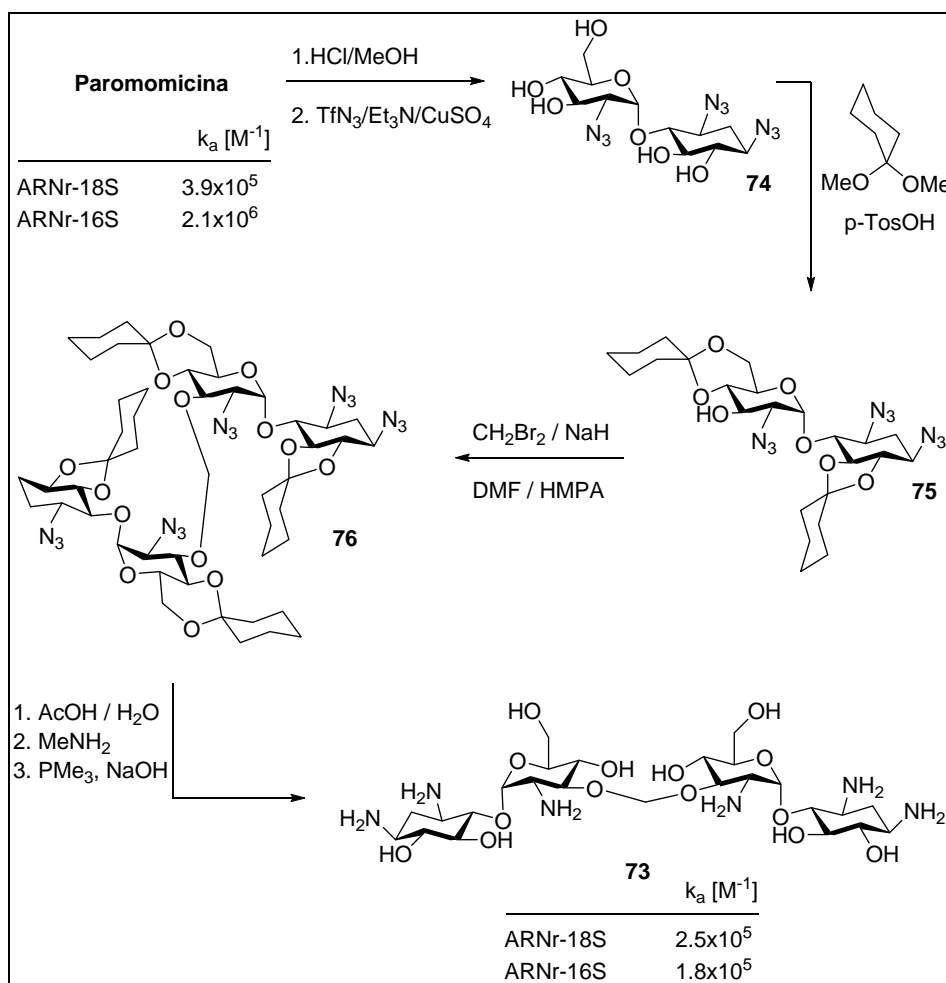
A la vista de estos datos, no es de extrañar que recientemente algunos grupos de investigación hayan centrado sus esfuerzos en la obtención de ligandos de tipo aminoglicósido con mayor selectividad por el ARNr procariota que por el eucariota, lo que en principio reduciría sustancialmente su toxicidad.

A esto hay que añadir que en los últimos años se ha demostrado la capacidad de algunos aminoglicósidos para el tratamiento de enfermedades originadas por la presencia de mutaciones genéticas, tales como la fibrosis cística, la distrofia muscular Duchenne, el síndrome de Usher y el de Hurler y algunos tipos de cáncer.¹⁴⁰ Esto puede explicarse si se tiene en cuenta que algunos derivados de este tipo son capaces de suprimir la terminación inducida por la presencia de codones stop prematuros debidos a mutaciones genéticas (figura 4.4).¹⁸²

Figura 4.4. Supresión de codones stop prematuros en eucariotas por aminoglicósidos

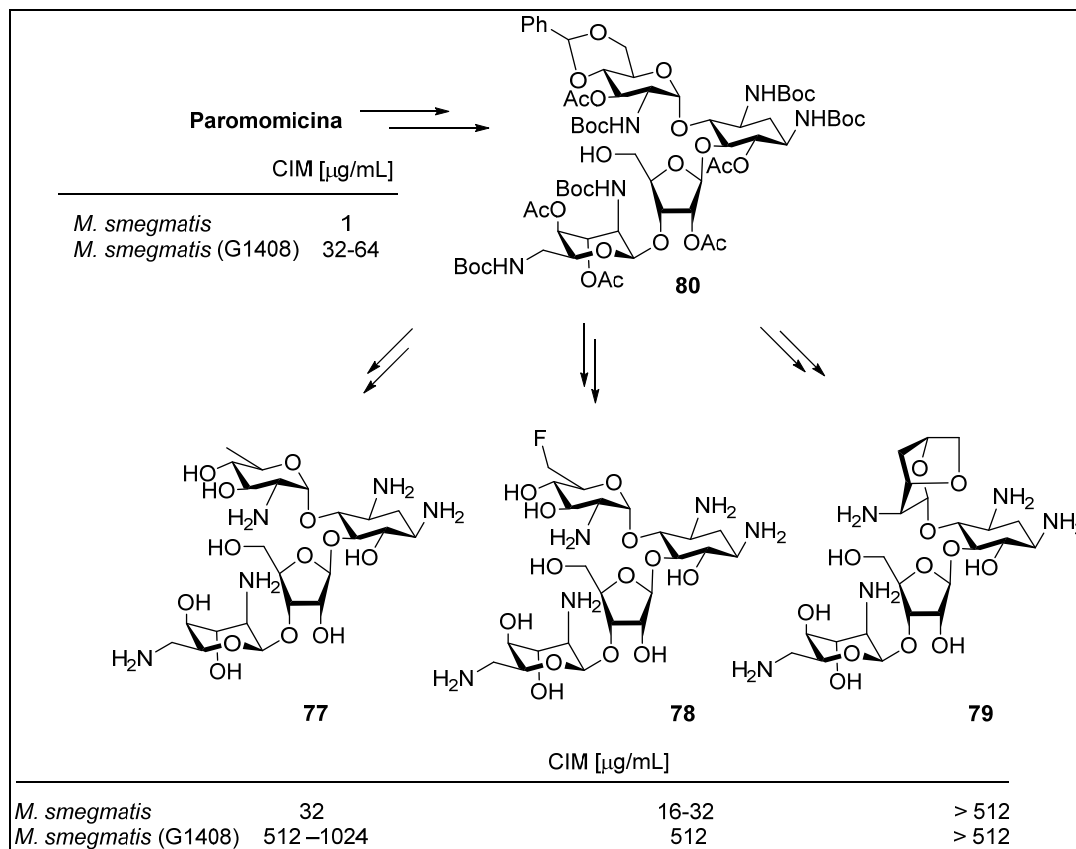


Por este motivo también resulta interesante el diseño de nuevos aminoglicósidos que presenten mayor selectividad por el ARNr eucariota que por el procariota, ya que permitiría su utilización para el tratamiento de los desordenes genéticos anteriormente mencionados. En este contexto Basoov y col. prepararon en el 2006 el primer ligando de tipo aminoglicósido **73** con mayor afinidad por el ARNr eucariota que por el ARNr procariota, tal como se muestra en el esquema 4.1.^{180a, 183}

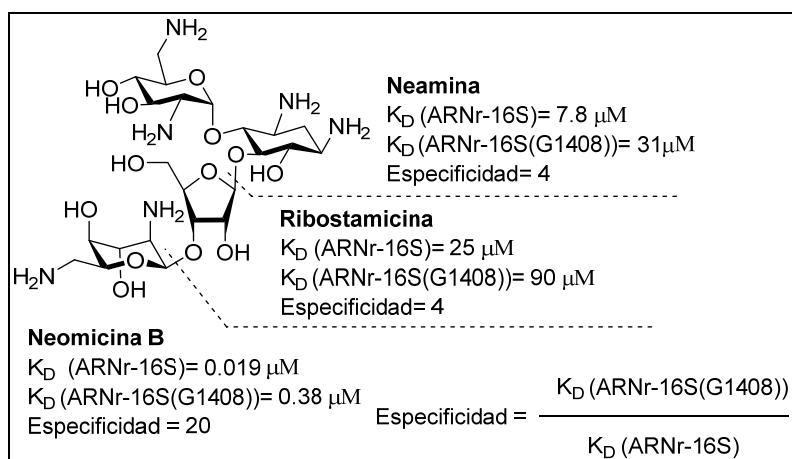
Esquema 4.1. Síntesis del ligando 73 y su afinidad por diferentes ARNs

Por el contrario el grupo de Vasella ha sintetizado derivados de paromomicina a través de la sustitución del metilen-amino de la posición 5' del anillo I por un metilo (**77**), un flúor (**78**) o a través de la formación del anhídrido entre las posiciones 3' y 6' del anillo I del mismo antibiótico (**79**).¹⁸⁴ con objeto de mejorar la selectividad por el ARNr procariota, evitando la interacción clave del amino 6' con la G1408 del ARNr eucariota. Aunque los derivados **77-78** resultaron peores antibióticos que la paromomicina de partida, sin embargo, perdían su actividad totalmente cuando se utilizaba un mutante mimético del ARNr (18S) en el que la A1408 ha sido sustituida por una G1408.

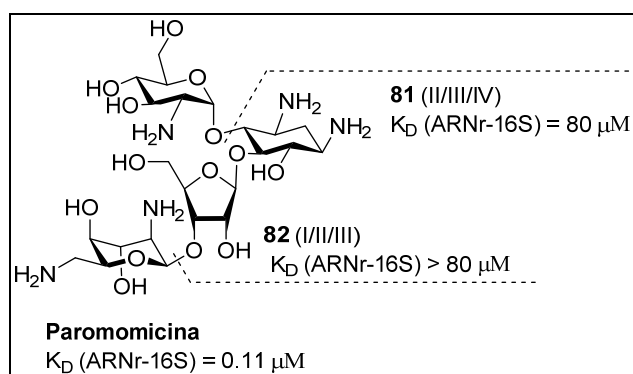
Esquema 4.2. Síntesis de **77-79** y su afinidad por la cepa silvestre de *M. smegmatis* y por una mutante A1408→G1408



Por otro lado, y con objeto de sintetizar nuevos ligandos con mayor afinidad por el ARNr procariota se ha establecido la influencia que cada uno de los anillos tiene en la actividad antibiótica en los aminoglicósidos 4,5-disustituidos en la unión al ARN 16S. Según estudios llevados a cabo por Wong y col. en el caso de la neomicina B los anillos III y IV contribuyen significativamente tanto a la afinidad del antibiótico por el ARNr procariota como a la especificidad de la unión (figura 4.5).^{98a}

Figura 4.5. Afinidad y especificidad de los fragmentos de la neomicina B

Finalmente, Ding y col. han descrito que en el caso de la paromomicina el fragmento constituido por los anillos II/III/IV (**81**) presenta mayor afinidad por el ARNr procariota que el formado por las unidades I/II/III (**82**) (figura 4.6).^{123c}

Figura 4.6. Afinidad de los fragmentos de la paromomicina

Sin embargo, en el caso de los antibióticos 4,6-disustituidos no existen datos en la bibliografía sobre la influencia que cada uno de los anillos tiene en la afinidad de estos aminoglicósidos por el ARNr procariota y eucariota, dato fundamental a la hora de diseñar nuevos aminoglicósidos con menor toxicidad.

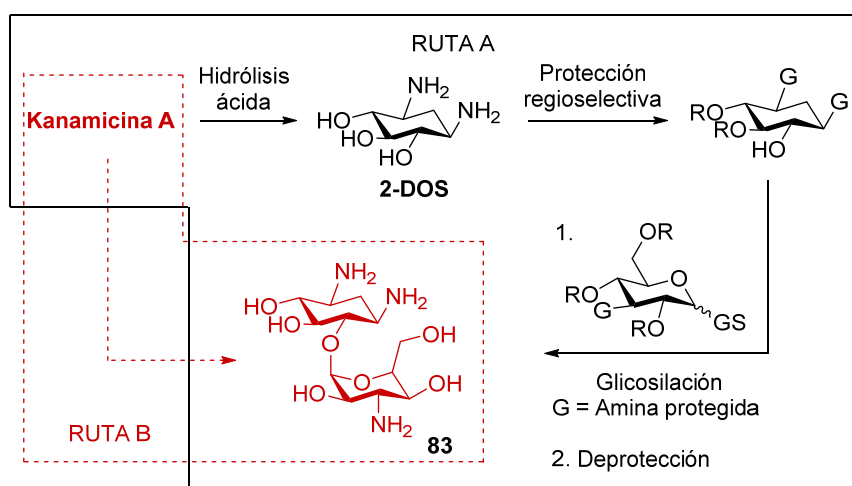
4.2.2. Objetivos

Por este motivo en primer lugar nos planteamos la preparación del fragmento constituido por los anillos II y III (**83**) de kanamicina que, a priori, y a partir de los datos descritos anteriormente, debería mantener la actividad antibiótica.

Para la preparación del fragmento **83** una posible ruta sería la obtención de la 2-DOS (anillo II)¹⁸⁵ mediante hidrólisis ácida y posterior introducción del anillo III^{98b} (ruta A, esquema 4.3). Esta ruta presenta varios inconvenientes entre los que destacan la dificultad para la protección de la 2-DOS obtenida por hidrólisis ácida, ya que se trata de una forma meso y el gran número de etapas necesarias para la obtención del anillo III de kanamicina preparado para una reacción de glicosilación.

A la vista de la dificultad y del elevado número de etapas de la ruta en este Capítulo se planteó la preparación por primera vez de **83** mediante la eliminación del anillo I a través de una oxidación del mismo (ruta B, esquema 4.3).

Esquema 4.3. Posibles rutas para la preparación del pseudo-disacárido **83**



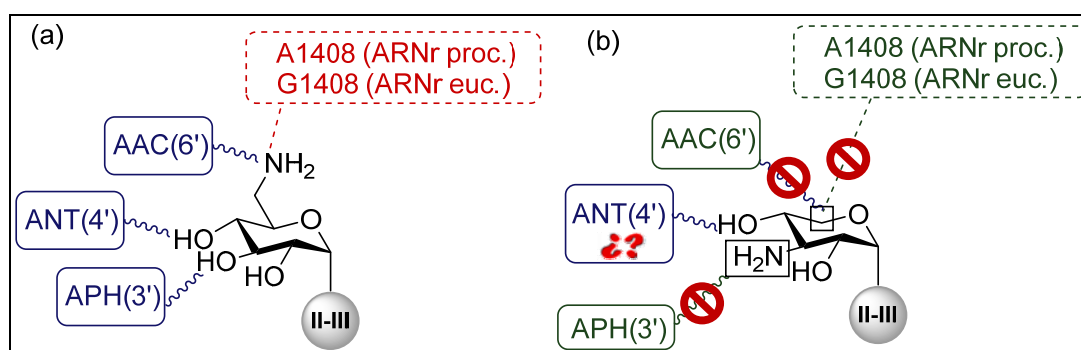
Una vez preparado **83** y si nuestra hipótesis de partida es cierta, es decir mantiene la afinidad este fragmento será utilizado para la preparación de un nuevo aminoglicósido diseñado con el objetivo de evitar la inactivación del mismo por parte de algunas enzimas modificadoras y reducir la toxicidad.

Como punto de partida del diseño llevamos a cabo un análisis detallado de la función que desempeña cada uno de los grupos funcionales presentes en el anillo I de la kanamicina en dos aspectos fundamentales (figura 4.7a):

- Interacción con el ARNr eucariota y procariota.
- Inactivación enzimática.

De este análisis surgieron las posibles modificaciones que podrían estar permitidas para aumentar la afinidad por el ARNr procariota frente al eucariota y evitar que este nuevo compuesto sea sustrato de algunas enzimas de resistencia (figura 4.7b).

Figura 4.7. (a) Función de cada grupo funcional del anillo I de kanamicina en su unión al ARNr procariota y eucariota (rojo) y en los procesos de inactivación enzimática (azul). (b) Modificaciones propuestas en este capítulo para mejorar la afinidad y evitar la resistencia enzimática en algunas posiciones claves (verde).



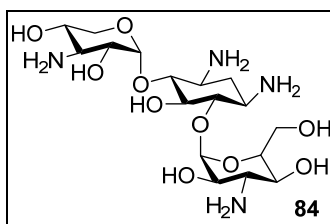
El amino 6' de la kanamicina A, y tal como ya se ha comentado anteriormente, es el responsable de la unión al ARNr eucariota a través de un contacto con G1408. Sin embargo, en el caso del ARNr procariota aunque la presencia de un grupo amino es fundamental, su posición no resulta ser la clave. De hecho, existen antibióticos naturales como la paromomicina que no lo tienen en dicha posición. En lo que respecta a las enzimas de resistencia este amino no sólo es modificado por la AAC(6') sino que, tal como se ha demostrado en nuestro grupo recientemente,^{155a} es fundamental para que la modificación enzimática por la ANT(4') tenga lugar.

A la vista de estos datos hemos establecido una hipótesis que considera que la eliminación del grupo metilen-amino podría tener un efecto muy positivo tanto en la inactivación enzimática del nuevo derivado como en su toxicidad. Partiendo de esta hipótesis, en la segunda parte de este Capítulo se recoge la síntesis y estudios de actividad biológica de un nuevo trisacárido con una xilosa (figura 4.7b) en el anillo I en lugar de la 6-desoxi-6-amino-glucosa natural (figura 4.7a). Este compuesto incorpora en la posición 3' del anillo de xilosa un grupo amino, ya que tal como se ha demostrado la presencia de este grupo funcional en el anillo I es esencial para su actividad antibiótica. Sin embargo, y a diferencia de algunos antibióticos naturales como la paromomicina o la kanamicina B, que contienen este grupo en posición 2', hemos considerado la

introducción del mismo en posición 3' con el objetivo de evitar a su vez la inactivación enzimática por parte de la APH(3'), una enzima muy relevante en el ámbito clínico (figura 4.7b).

En la figura 4.8 se muestra la estructura del derivado propuesto (**84**) que combina la estructura clásica de los aminoglicósidos 4,6-disustituidos con algunas variaciones en el anillo I, diseñadas para reducir la toxicidad y la resistencia enzimática.

Figura 4.8. Estructura del aminoglicósido propuesto **84**



Una de las tendencias actuales en el diseño de nuevos compuestos es la realización de un estudio teórico de cómo el ligando interactuará con las correspondientes dianas antes de llevar a cabo la síntesis del derivado. Por este motivo, en primer lugar realizamos un estudio de docking del derivado **84** con el ARNr procariota (16S) y con el ARNr eucariota (18S).

4.3. Resultados y discusión

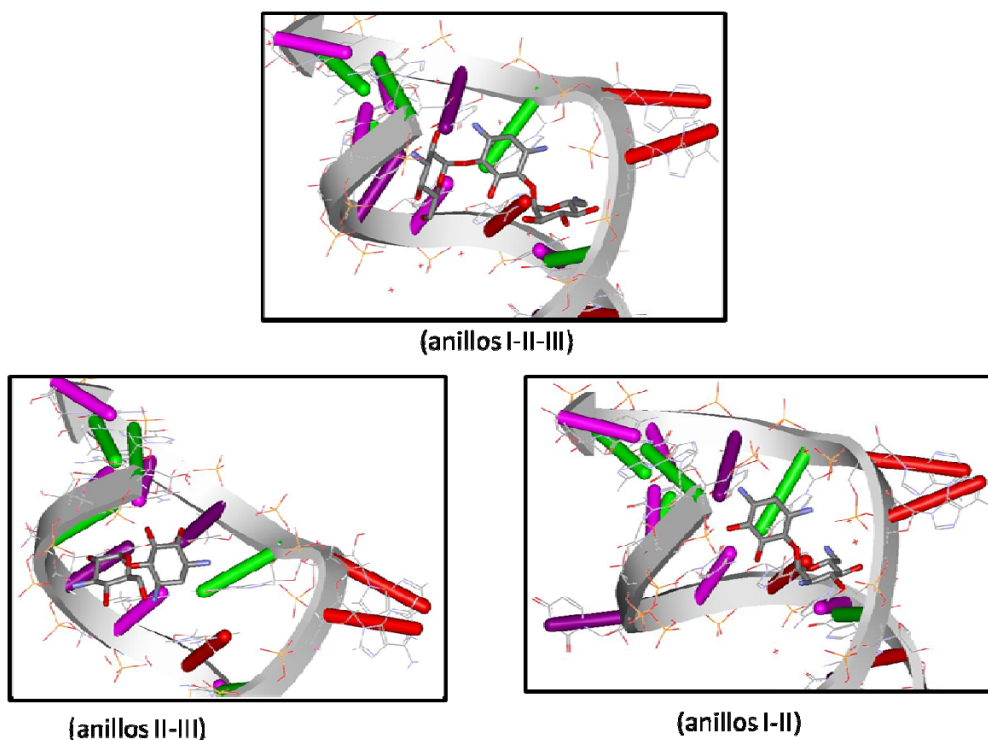
4.3.1 Estudios *in silico* de interacciones ligando-receptor

En una primera etapa nos planteamos llevar a cabo un estudio sobre el modo de unión del pseudo-disacárido **83** con el ARNr 16S con objeto de comprobar que este fragmento sigue uniéndose a la misma zona que la kanamicina A pudiendo emplearse como unidad mínima para el diseño de nuevos antibióticos (farmacóforo).

En la figura 4.9 se observan las siguientes estructuras: (a) cristal del complejo kanamicina A-ARNr 16S (pdb:2esi), (b) cristal del complejo formado por la neamina (fragmento de la kanamicina A constituido por los anillos I y II) y el ARNr-16S (pdb:2f4s) y (c) docking del compuesto **83** (fragmento constituido por los anillos II-III de kanamicina A) con el ARNr 16S procariota. En ellas puede observarse que la conformación de los anillos II y III presenta un alto grado de conservación con respecto a la kanamicina A, lo cual nos indica que **83** podría ser un buen punto de partida para el

diseño y síntesis de nuevos antibióticos manteniendo la afinidad por el 16S ARN procariota.

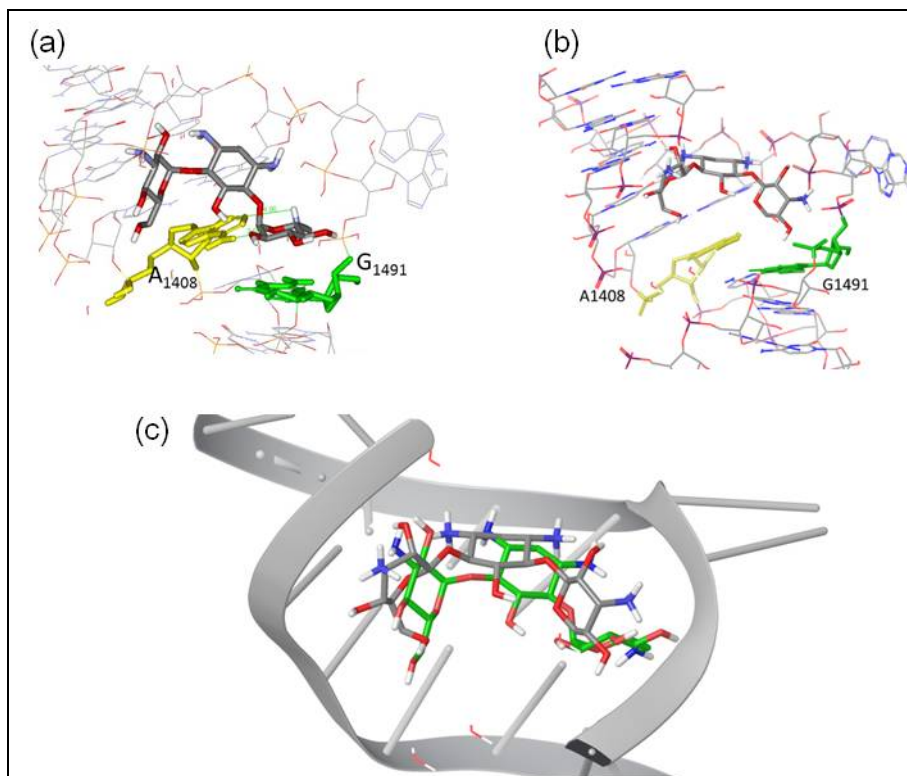
Figura 4.9. Complejos (a) kanamicina A-ARNr 16S (pdb:2esi) (b) neamina-ARNr 16S (pdb:2f4s) y (c) modo de unión de **83** con el ARNr 16S



Posteriormente y para conocer el modo de unión del derivado **84** en el sitio A procariota llevamos a cabo estudios de docking, utilizando para ello la estructura cristalográfica del complejo entre la kanamicina A y el ARNr (16S) (pdb:2esi), usando el programa Glide de Maestro.

De los resultados obtenidos, seleccionamos la mejor conformación por comparación con el complejo cristalográfico de partida. En la figura 4.10 se presenta los complejos kanamicina A (a) y el derivado **84** (b) con el 16S ARN procariota y la superposición de los mismos (c).

Figura 4.10. Estructura de (a): complejo kanamicina A- 16S ARNr (pdb:2esi), (b) complejo **84**-16S ARNr y (c) superposición de las dos estructuras, kanamicina A (verde) y derivado **84** (gris)

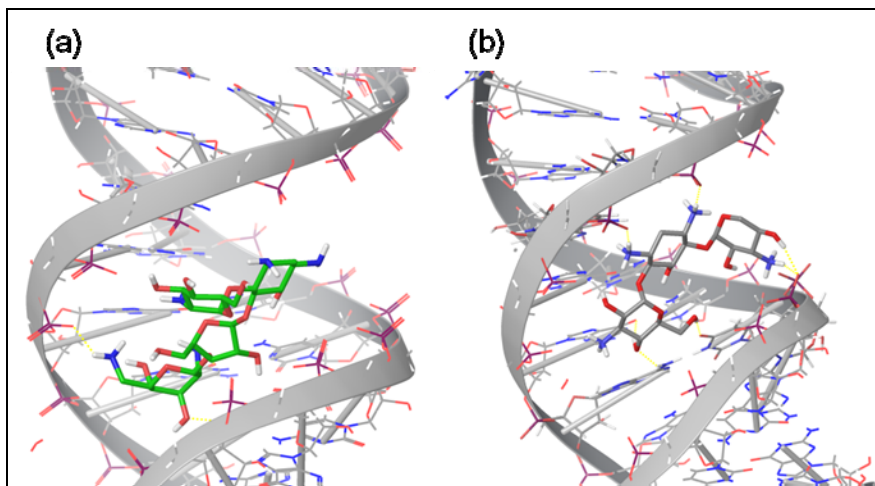


Tal como se observa en la figura 4.9c la conformación del anillo I para ambas estructuras es distinta y en el caso del compuesto **84** se pierde la interacción del grupo amino de la posición 6' con la A1408, así como la del O endocíclico del anillo I con dicho residuo. Sin embargo, no consideramos que la pérdida de estos contactos pueda ser determinante para la actividad antibiótica del derivado **84**, ya que sigue manteniendo cinco interacciones con el ARNr 16S de tipo intermoleculares.

En una siguiente etapa estudiamos computacionalmente el modo de unión del derivado **84** en el sitio de reconocimiento del 18S ARNr citoplasmático eucariota (figura 4.11). Se utilizó como patrón la estructura cristalográfica del complejo paromomicina- ARNr 18S (pdb: 2O3w). En este caso fue necesario el empleo de un complejo con un 4,5-aminoglicósido ya que no se ha descrito hasta la fecha ninguna estructura del ARNr 18S con un 4,6-aminoglicosido, lo que limitó considerablemente la comparación entre ambas estructuras. Aun así, fue posible deducir que la unión del nuevo derivado **84** tiene lugar en el surco mayor, como en el caso de todos los

aminoglicosidos, no pudiendo sacar ninguna conclusión sobre la disposición de los anillo, ya que, debido a su diferente estructura es muy distinta entre ambos.

Figura 4.11. (a) Estructura del complejo 18S ARN- Paromomicina (pdb: 2O3w) y (b) modo de unión del complejo derivado **84**-ARNr 18S.



Lo que si se observa en la estructura mostrada en la figura 4.10b es que el derivado **84** pierde el contacto con la G1408 tal como habíamos supuesto. Este hecho, unido a que únicamente presenta tres interacciones intermoleculares con el ARNr eucariota frente a las cinco del ARNr procariota parece ser un buen indicio de que el compuesto **84** debería presentar menor afinidad por el ARNr eucariota que la kanamicina A y por ello menor toxicidad manteniendo sin embargo su afinidad por el ARNr procariota.

A la vista de estos datos nos propusimos la síntesis de los compuestos **83** y **84**, tal como se recoge en el siguiente apartado.

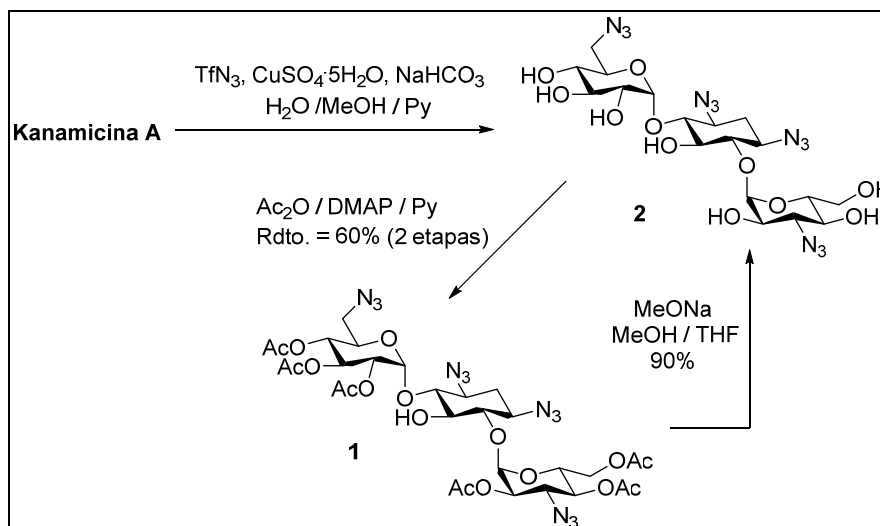
4.3.2. Síntesis del pseudo-disacárido constituido por los anillos II y III del antibiótico natural kanamicina (**83**)

La estrategia más directa para la eliminación de un anillo en un antibiótico aminoglicósido implica el tratamiento del antibiótico con una disolución de HCl y ha sido aplicada en numerosas ocasiones debido a su sencillez y altos rendimientos.¹⁸⁶ Sin embargo presenta una limitación y es que únicamente es posible la obtención del fragmento que se produce por ruptura del enlace glicosídico más lábil en medio ácido, que en el caso de la kanamicina A es el que une los anillos II y III.

Por este motivo en nuestro caso decidimos emplear una estrategia alternativa que ya había sido descrita en algunas ocasiones en la bibliografía¹⁸⁷ consistente en la eliminación de los anillos a través de una reacción de oxidación de un diol y posterior eliminación del di-aldehído formado en medio básico. Para la eliminación del anillo I de kanamicina A, y a la vista de los antecedentes indicados anteriormente, el reactivo oxidante elegido fue el NaIO_4 , fundamentalmente por las condiciones suaves de reacción.

Tal como se muestra en el esquema 4.4 en primer lugar se llevó a cabo la enmascaración de los grupos amino como azidas, empleando una reacción de diazotransferencia.

Esquema 4.4. Enmascaración de los grupos amino de kanamicina A

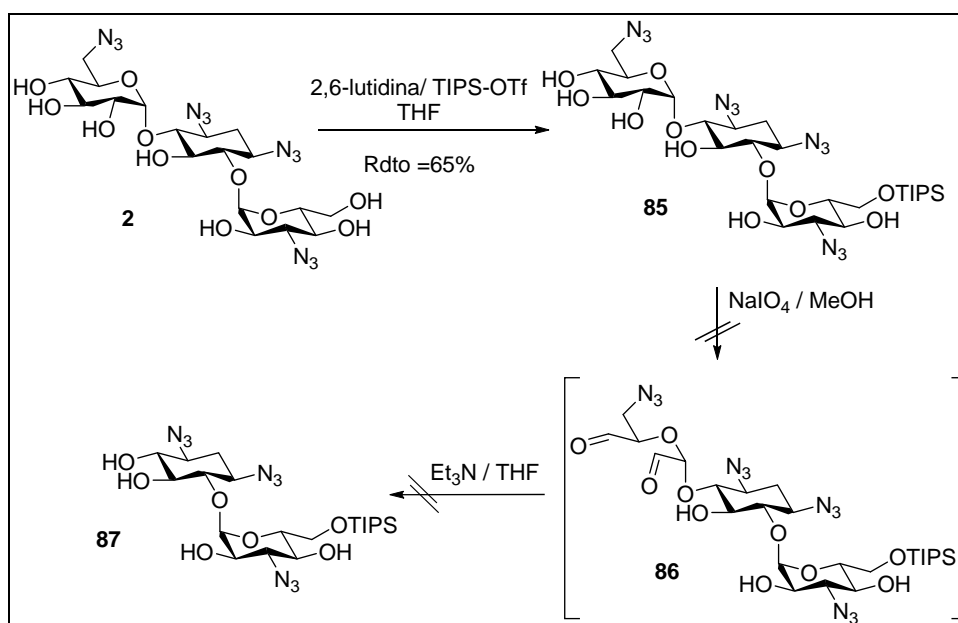


Para ello empleamos como agente de diazotransferencia azida triflica (TfN_3), obtenida inmediatamente antes de su utilización como una disolución 2M en tolueno, según el procedimiento puesto a punto en grupo de investigación.¹⁰⁰ De este modo sobre una disolución acuosa de kanamicina A en forma de base libre y una cantidad catalítica de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se adicionó la disolución de TfN_3 recién preparada, obteniéndose una mezcla heterogénea, que fue homogeneizada mediante la adición sobre ella de una mezcla de piridina y MeOH (1:1, v/v). Debido a la dificultad en la purificación del producto final 2 se llevó a cabo una acetilación “*in situ*”, utilizando anhídrido acético en piridina y DMAP como catalizador, obteniéndose el derivado 1 puro. La desprotección de los grupos hidroxilo por tratamiento de 1 en medio básico con metóxido de sodio en

una mezcla de THF y MeOH permitió la obtención del derivado **2** con un rendimiento global del 54% a partir de la kanamicina A.

La posterior protección como silil-éter del alcohol primario de la posición 6'' del anillo III de **2** utilizando triisopropil-silil-triflato (TIPS-OTf) como agente sililante, 2,6-lutidina como base y THF como disolvente, condujo al derivado **85** con un rendimiento del 65%, sobre el que se llevaron a cabo las primeras pruebas de oxidación (Esquema 4.5.).

*Esquema 4.5. Síntesis de **85** y primeras pruebas de oxidación*

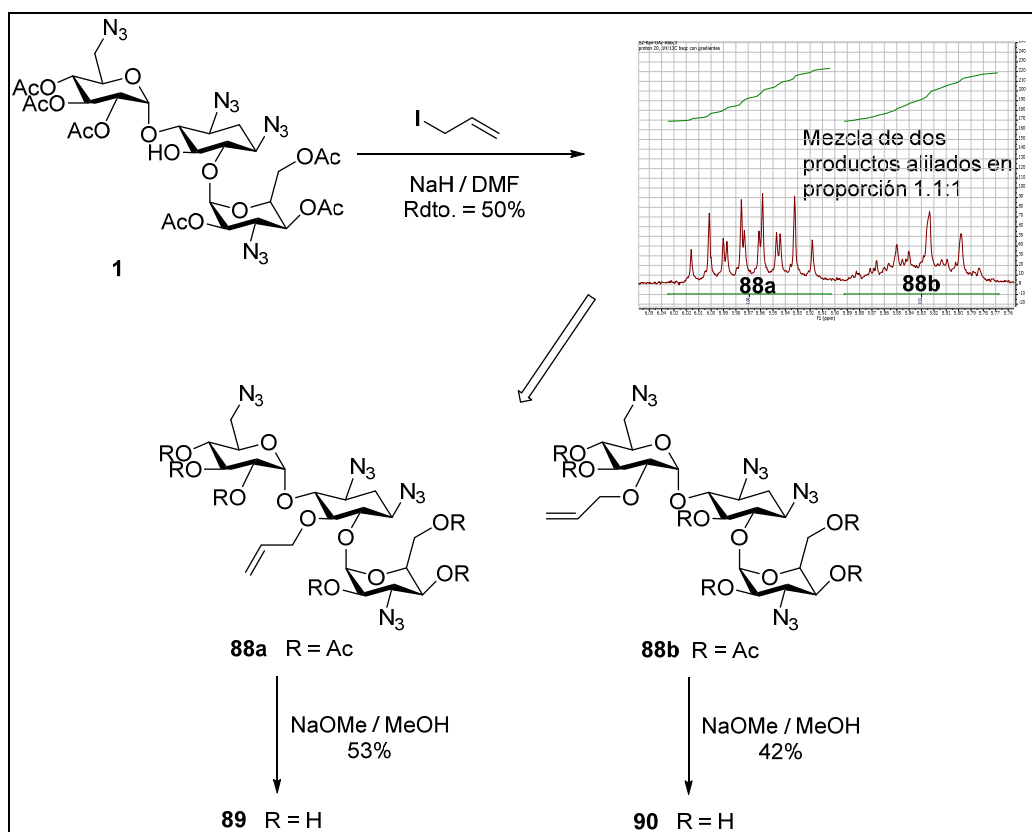


Sin embargo, cuando una disolución del compuesto **85** en MeOH se trató con peryodato de sodio en metanol para oxidar el diol, obteniendo hipotéticamente **86**, y tras la eliminación del exceso de agente oxidante, con TEA en THF se observó la formación de varios productos, siendo imposible el aislamiento del producto deseado **87** de la compleja mezcla de reacción. Esto pudo deberse a que además de **86** en el medio de reacción también se formaba producto **87** que sufrió una subsecuente oxidación del diol del anillo de 2-DOS. Por este motivo se ensayó la utilización de dos equivalentes de agente oxidante, obteniendo conversiones muy bajas y algunos productos de descomposición como en el caso anterior, lo que parecía indicar que la oxidación del diol del anillo de 2-DOS era más rápida que el del anillo I, lo que nos llevó a modificar la ruta sintética.

Esta ruta alternativa incluía antes de la oxidación la protección de la posición 5 del anillo de 2-DOS junto con la del hidroxilo primario 6'' del anillo III. Para ello utilizamos el derivado **1** como producto de partida que, tal como había sido descrito anteriormente en nuestro grupo,¹⁰⁹ mantenía libre la posición 5 del anillo de 2-DOS tras llevar a cabo la acetilación de **2** en condiciones estándar.

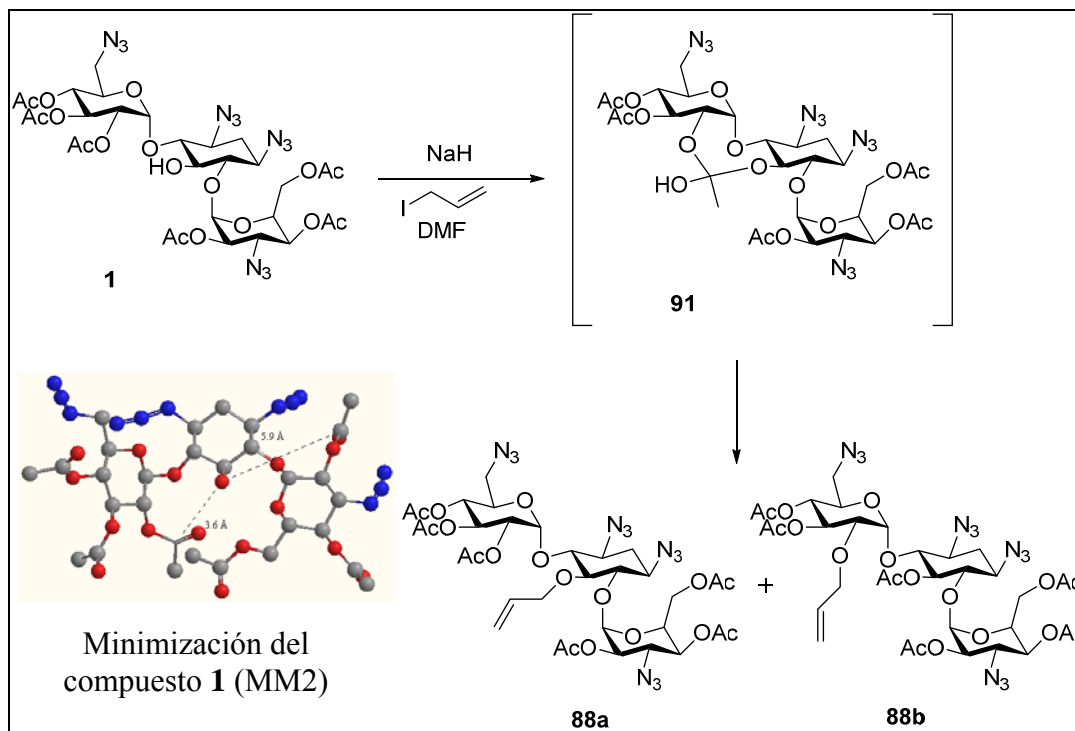
La protección requerida no estaba descrita en la literatura para el antibiótico kanamicina A, pero sí para la tobramicina. El procedimiento consistía en la reacción del derivado **1** con yoduro de alilo (Al-I), utilizando NaH como base en DMF, en una típica reacción de alilación.¹⁰⁸ Debido a la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en la utilización de grupos protectores en aminoglicósidos decidimos, en una primera aproximación la sustitución del yoduro de alilo por bromuro de bencilo (BnBr) y por metil-clorometil-éter (MOMCl). Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron mezclas de productos que no pudieron ser ni separados ni identificados, achacando el fracaso a la posible migración de los grupos acetilos.

Estos dos intentos infructuosos nos llevaron a retomar la estrategia descrita en la bibliografía, es decir, utilizar el alilo como grupo protector, ya que los autores no observaron la formación de mezclas durante la protección. Sin embargo, en nuestro caso, el tratamiento de **1** con yoduro de alilo en las condiciones comentadas anteriormente dio lugar a una mezcla de dos productos **88a** y **88b** en una proporción 55:45. Los compuestos resultantes de la alilación únicamente pudieron separarse tras la desprotección de los grupos hidroxilo (esquema 4.6). Así se obtuvieron **89** y **90**, que fueron caracterizados por espectroscopía de RMN (¹H, ¹³C, COSY y HSQC) y que confirmó nuestra hipótesis de que el origen del compuesto **90** era la migración del grupo acetilo desde la posición 2' del anillo I a la posición 5 de la 2-DOS.

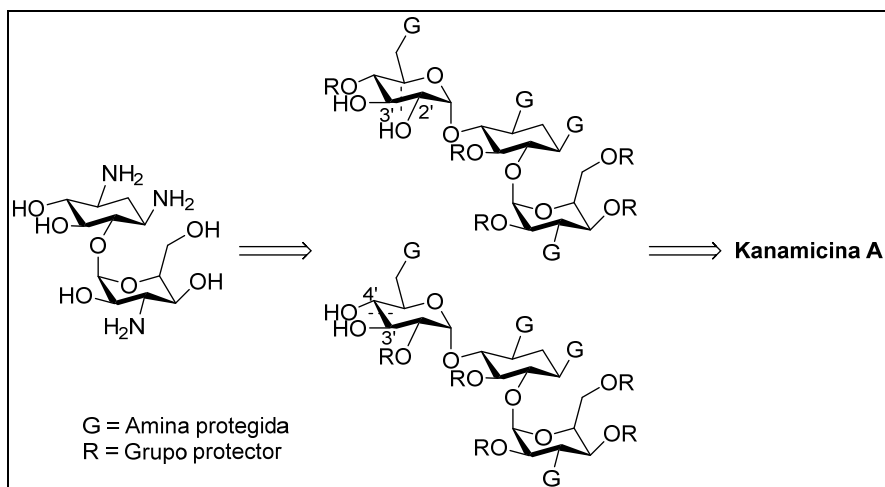
Esquema 4.6. Alilación del compuesto 1

La formación del producto **88b** puede explicarse a través de la formación del intermedio de tipo ortoéster **91** (esquema 4.7).¹⁸⁸ Aunque en general la migración tiene lugar entre grupos hidroxilo adyacentes, sin embargo, en el caso del compuesto **1** el carbono del grupo acetato que se encuentra sobre el hidroxilo 2' se encuentra a una distancia aproximada de 3.6Å (esquema 4.7) del oxígeno de la posición 5 del anillo de la 2-DOS según los resultados de la minimización utilizando un nivel de cálculo MM2, lo que hace posible el ataque del oxígeno de 5 sobre el acetato de 2'. Además estos datos están plenamente de acuerdo con el hecho de que Hanessian y col. no observen mezclas, debido a que en tobramicina en la posición 2' no hay un grupo hidroxilo.¹⁰⁸

Esquema 4.7. Mecanismo propuesto para la migración del acetilo de la posición 2' del anillo I a la posición 5 de la 2-DOS y minimización del compuesto **1**

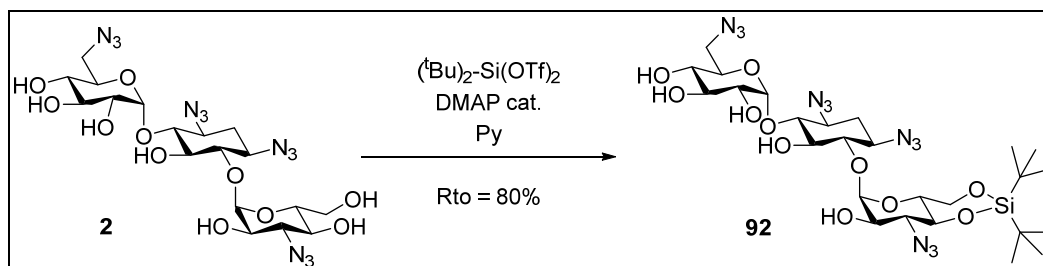


La dificultad encontrada para la preparación de **83** hasta este momento nos llevó a plantearnos una nueva estrategia. A la vista de la estructura del anillo I de la kanamicina A, la síntesis de **83** era posible mediante la oxidación de los dioles 2'/3' y 3'/4' sobre derivados de kanamicina A completamente protegidos, tal y como se muestra en el esquema 4.8.

Esquema 4.8. Análisis retrosintético de 83

La obtención de los intermediarios claves de la ruta se llevó a cabo en una secuencia sintética en cuatro pasos. El primer paso, al igual que en el caso anterior, fue la protección del hidroxilo primario de la posición 6'' del anillo III del compuesto **2**. Aunque en la bibliografía hay diversos ejemplos en los que este grupo funcional ha sido protegido como un silil-éter,¹⁰⁰ sin embargo, en nuestro caso decidimos la protección conjunta de los hidroxilos 6'' y 4'' a través de la formación de un acetal de silicio. La elección de este grupo protector fue hecha en base a las siguientes razones: (a) el acetal presenta mayor estabilidad en medio ácido que el silil-éter, (b) permite la protección simultánea de dos posiciones haciendo el procedimiento más económico y (c) aunque en general la migración del grupo silicio tiene lugar hacia el hidroxilo primario desde el secundario, al utilizar el acetal se evita la formación de subproductos.

El tratamiento de **2** con di-terc-butilsililo-bis-triflato ($^t\text{Bu}_2\text{Si}(\text{OTf})_2$) con DMAP en piridina dio lugar al compuesto **92** con un rendimiento del 80% (esquema 4.8).

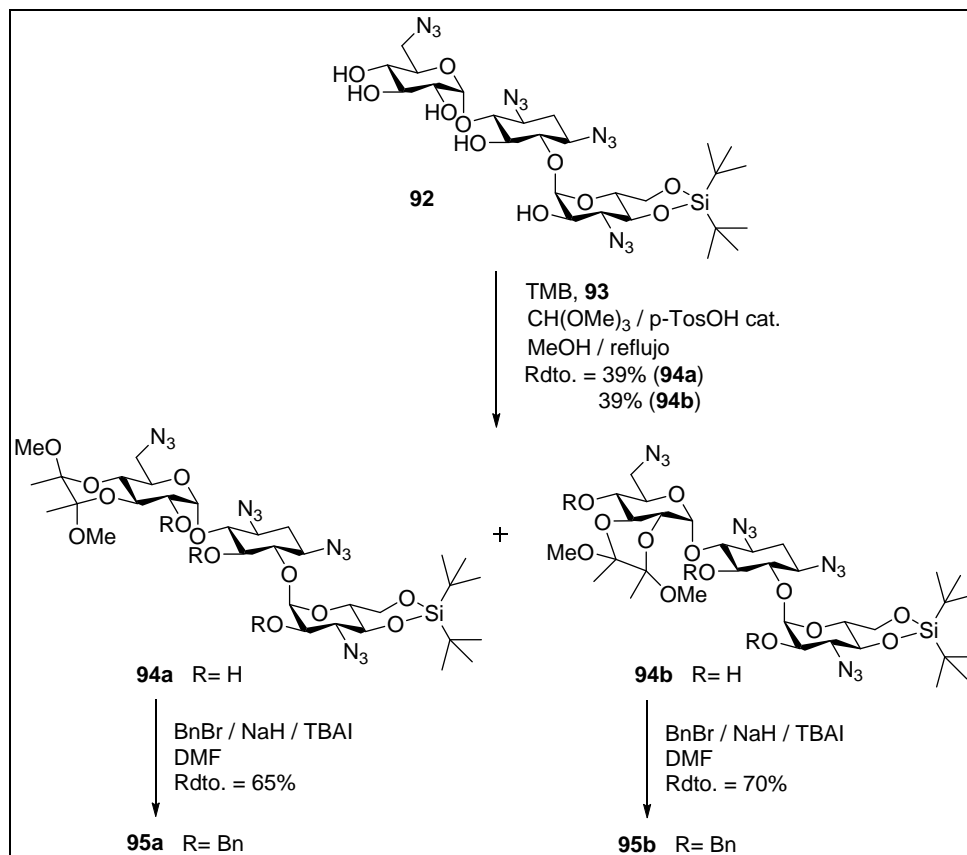
Esquema 4.8. Formación del acetal de silicio entre las posiciones 6'' / 4''

En una segunda etapa se llevó a cabo la protección de las posiciones 2'/3' y 3'/4' del anillo I como 2,3-butanodiona-bis-dimetilacetales (BBA), lo que pasa por la preparación previa del correspondiente reactivo 2,2,3,3-tetra-metoxibutano (TMB, **93**).¹⁸⁹ Para ello una disolución de 2,3-butanodiona y tri-metil-ortoformiato en metanol se trató con ácido sulfúrico, obteniendo el reactivo TMB **93** como un aceite amarillo que fue utilizado sin purificación previa. La elección de este grupo protector se hizo en base a datos descritos en la bibliografía sobre la formación de mezclas de acetales en aminoglicósidos cuando se utilizaba ciclohexil-dimetil-acetal¹²⁹ o benciliden-dimetil-acetal.¹⁹⁰

El tratamiento de **92** con TMB (**93**) en presencia de tri-metil-ortoformiato y una cantidad catalítica de ácido *p*-TosOH en DMF generó la mezcla del diol 2'/3'(**94a**) y el 3'/4' (**94b**) en una proporción 1:1, separables por cromatografía en columna (esquema 4.9). La estructura de ambos compuestos fue determinada inequívocamente mediante técnicas de ¹H-RMN y ¹³C-RMN y en base a experimentos de correlación homonuclear ¹H-¹H (*g*-COSY), donde en el compuesto **94a** se observa una correlación entre el protón anomérico unido al C-1 a 5.18 ppm con el protón unido al C-2 a 3.86 ppm, cuyo desplazamiento coincide con el de un protón unido a un carbono con un hidroxilo desprotegido. En el caso del compuesto **94b** el protón unido a C-1 a 5.06 ppm correlaciona en un experimento similar con el del hidrógeno unido al C-2 a 3.44 ppm, siendo en este caso el desplazamiento de un protón unido a un carbono con el hidróxido protegido en forma de acetal. En un primer momento, y con el objetivo de poner a punto la ruta sintética, ésta se llevó a cabo con cada uno de los regioisómeros **94a** y **94b** por separado.

El siguiente paso fue la bencilación de los regioisómeros **94a** y **94b** utilizando BnBr como agente bencilante, NaH como base y TBAI como catalizador en DMF seco, obteniendo los regioisómeros **95a** y **95b** respectivamente (esquema 4.9).

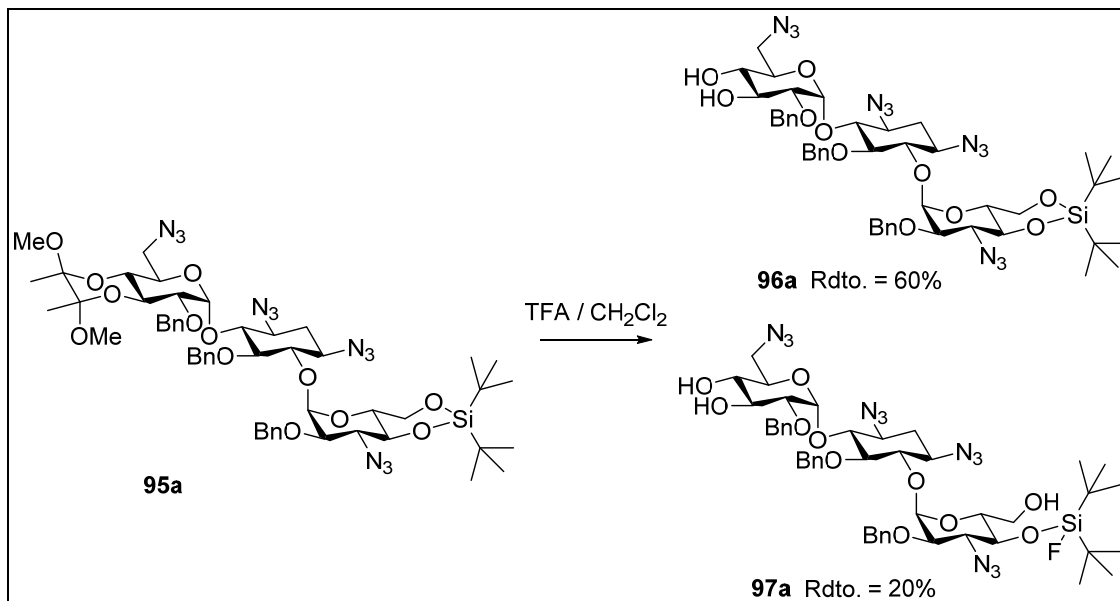
Esquema 4.9. Protección de los dioles 2'/3' y 3'/4' como acetales y bencilación del resto de hidroxilos



Finalmente, se desprotegeron los dioles 2'/3' y 3'/4' de **95a** y **95b** respectivamente por tratamiento de los mismos con TFA en CH₂Cl₂. Cuando inicialmente se llevó a cabo sobre el derivado **95a** se observó la formación de dos manchas en TLC cuando se utilizaba el sistema de eluyentes hexano:AcOEt (7:3). La purificación en cromatografía en columna nos permitió la obtención del producto de la desprotección esperado **96a** puro y de otro compuesto de estructura inicialmente desconocida. Dicho producto presentaba un pico molecular en su espectro de masas (Electrospray, modo positivo) a m/z 1019 [(M + 1)⁺] y unas señales en su espectro de ¹H-RMN muy similares a las del producto de desprotección **96a**. Con objeto de recabar más información sobre la estructura de este compuesto decidimos ensayar la acetilación del mismo en condiciones estándar, observándose cuando se registró el espectro de ¹H-RMN de la reacción la aparición de tres señales en el entorno de 2.0-2.2 ppm, lo que indicaba la presencia de tres hidroxilos libres en el producto de partida, con estructura desconocida hasta el momento. En base a este resultado experimental y a

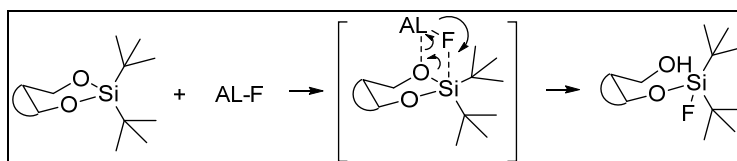
algunos trabajos encontrados en la bibliografía¹⁹¹ pudimos identificar el compuesto **97a** como el resultado de una apertura del acetal de silicio (esquema 4.10).

Esquema 4.10. Desprotección del diol 2'/3' de **95a**

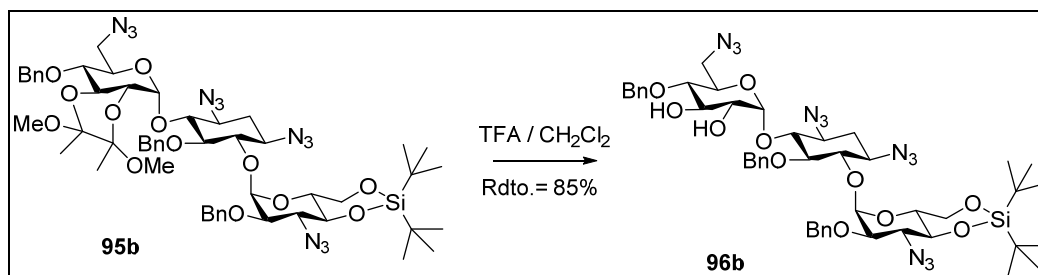


Esta apertura regioselectiva puede explicarse por la presencia de alguna impureza en el TFA comercial que pueda actuar como ácido de Lewis, coordinándose al oxígeno menos impedido del acetal y que sea capaz de transferir un flúor al silicio, siguiendo el mecanismo que se muestra en el esquema 4.11.

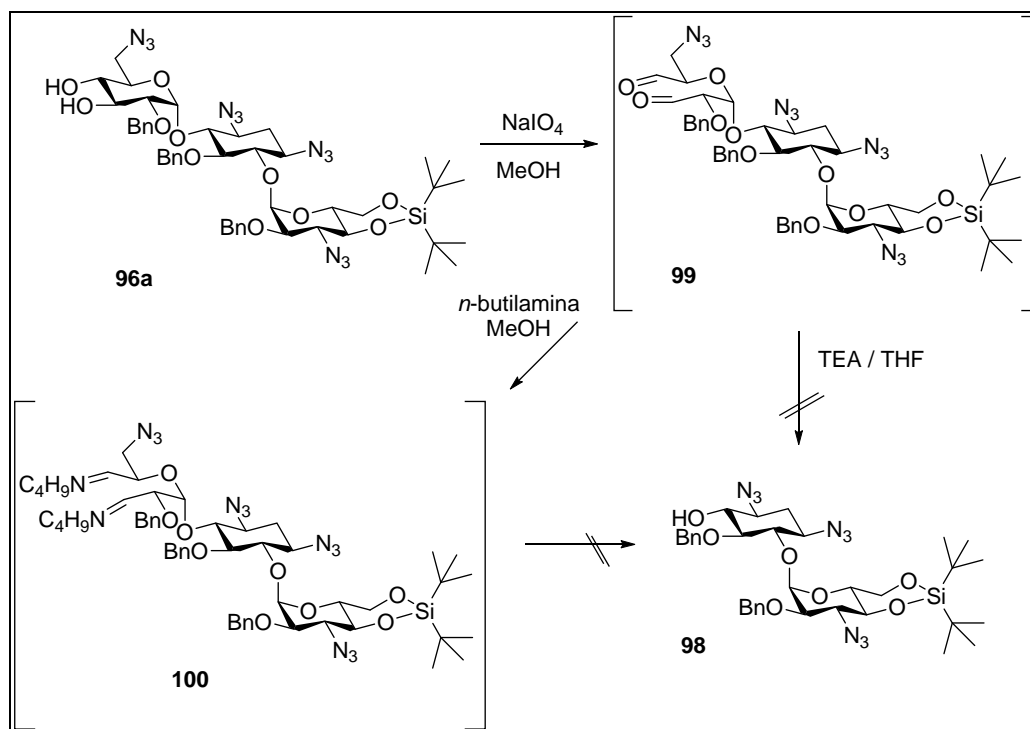
Esquema 4.11. Mecanismo propuesto para la apertura del acetal de silicio de **95a**



Este inconveniente pudo ser solucionado empleando para la reacción TFA, previamente tratado con anhídrido trifluoroacético y re-distilado. Así, el tratamiento de **95b** con TFA re-purificado en CH₂Cl₂ permitió la obtención de **96b**, no detectándose la formación del producto de apertura del acetal (esquema 4.12).

Esquema 4.12. Desprotección del diol 3'/4' de **95b**

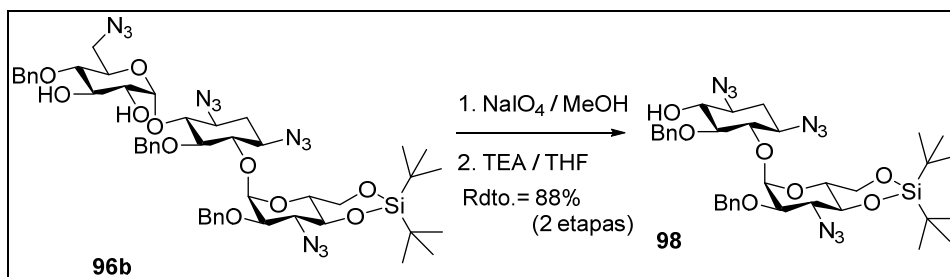
Una vez sintetizados **96a** y **96b** para la preparación del *pseudo*-disacárido **98** fue necesario poner a punto la reacción de oxidación. Para ello el compuesto **96a** se trató con NaIO₄ en MeOH y posteriormente con TEA en THF para eliminar el resto del anillo I del intermedio **99** (esquema 4.13). Sin embargo, tras purificar el crudo de la reacción en el espectro de ¹H-RMN se observaron señales en la zona de 9.5-10.5 ppm. Además el espectro de masa presentaba un pico molecular (Electrospray, modo positivo) a m/z 997 [(M + 1)⁺] lo que indicaba que aunque la oxidación había tenido lugar, sin embargo, el tratamiento con TEA no resultó efectivo.

Esquema 4.13. Oxidación del diol **96a**

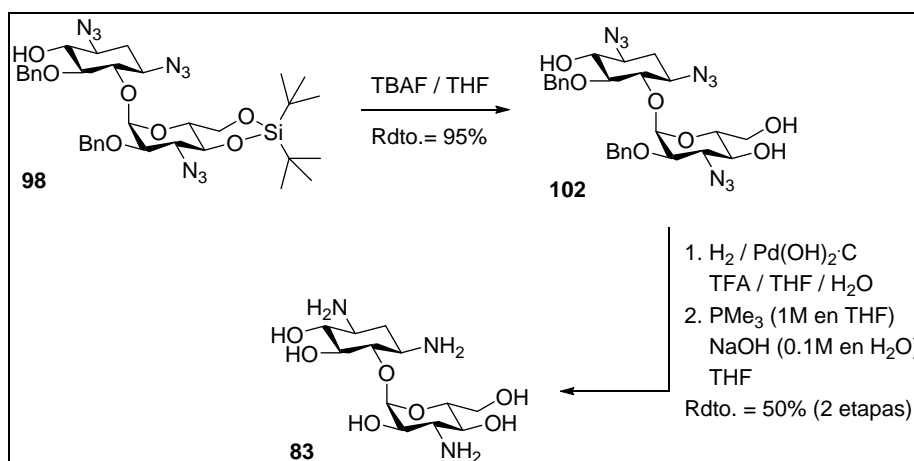
Cuando se intentó activar la eliminación a través de la formación de dos iminas con *n*-butilamina (**100**) no se observó tampoco la formación de **98**.

Sin embargo, al emplear el compuesto **96b** como producto de partida, el tratamiento del mismo con NaIO_4 en MeOH y posteriormente con TEA en THF dio lugar al pseudo-disacárido **98** (esquema 4.14). Idénticos resultados se obtuvieron cuando en la segunda etapa se llevó a cabo a través de la formación de iminas empleando *n*-butilamina en MeOH.

Esquema 4.14. Obtención del pseudo-disacárido **98**

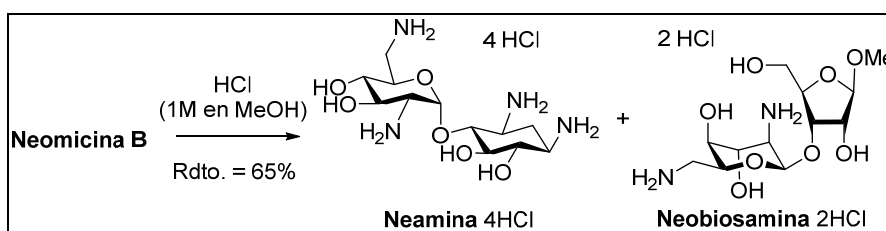


Por último se procedió a la desprotección de **98** para obtener el compuesto **83**. La eliminación del acetal de silicio se llevó a cabo empleando TBAF en THF, obteniéndose el intermedio **101**. Seguidamente se eliminaron las azidas a través de una reacción de Staudinger por tratamiento de **101** con PMe_3 (1M en THF) y NaOH (0.1M en H_2O) en THF, obteniéndose **102** que fue hidrogenado para eliminar los grupos protectores restantes. Para la hidrogenación catalítica se utilizó hidróxido de paladio soportado sobre carbono como catalizador, hidrógeno a presión moderada (10 bar) y medio ácido (TFA) en una mezcla de THF y H_2O (1:1) (esquema 4.15). Tras la cromatografía en columna del crudo el producto obtenido (**83**) fue re-purificado empleado para ello una columna de resina de intercambio iónico Amberlita® CG-50 utilizando como eluyente una disolución acuosa de NH_4OH 0.5M, obteniéndose el derivado **83** con un rendimiento global del 4.1% a partir de la kanamicina A (11 etapas).

Esquema 4.15. Obtención del pseudo-disacárido 83

Una vez sintetizado **83**, y antes de llevar a cabo la evaluación de su actividad fue necesaria la preparación de la neamina, fragmento constituido por los anillos I y II de kanamicina B con el objetivo de comparar sus actividades con las de los derivados naturales kanamicina A y B y validar el compuesto **83** como farmacóforo para el diseño de nuevos aminoglicósidos.

La obtención de la neamina se llevó a cabo según un procedimiento descrito en varias ocasiones durante la década de los noventa.¹⁹² La hidrólisis ácida del antibiótico natural neomicina B en forma de base libre con una disolución 1M de HCl en MeOH permitió la obtención de los fragmentos neamina y neobiosamina (esquema 4.16) como hidrocloruros, que fueron separados a través de un proceso de cristalización.

Esquema 4.16. Obtención de la neamina.

4.3.3. Actividades “*in vivo*” de la kanamicina A, B y de sus fragmentos neamina (anillos I y II) y **83** (anillos II y III).

Para la utilización de **83** como unidad mínima para la preparación de nuevos antibióticos, y tal como se ha comentado anteriormente, el primer requisito que debía

cumplir es que éste mantuviese algo de actividad antibiótica, lo que era indicativo de que todavía era ligando del ARNr.

En este apartado, y como punto de arranque para el diseño de nuevos antibióticos a partir de **83**, se realizaron únicamente medidas de CIM frente a una cepa *E.coli* tanto de los antibióticos naturales como de los fragmentos (tabla 4.2).

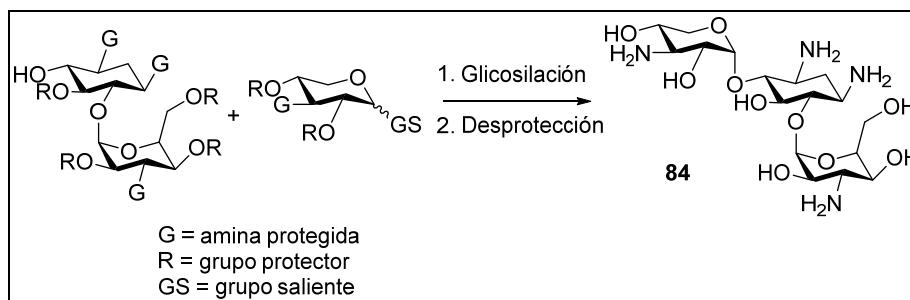
Tabla 4.2. Medidas de CIM frente a *E.coli*.

Compuesto	CIM (µg/mL)
Kanamicina B	2
Kanamicina A	4
Neamina	>50
83	50

A partir de los datos pudo concluirse que, aunque el fragmento **83** pierde parte de su actividad antibiótica cuando se compara con los derivados naturales kanamicina A y B, sin embargo, mantiene un valor adecuado para su utilización como unidad mínima en el diseño de nuevos aminoglicósidos con modificaciones en el anillo I, objetivo de este Capítulo.

4.3.4. Síntesis del aminoglicósido **84 derivado de xilosa.**

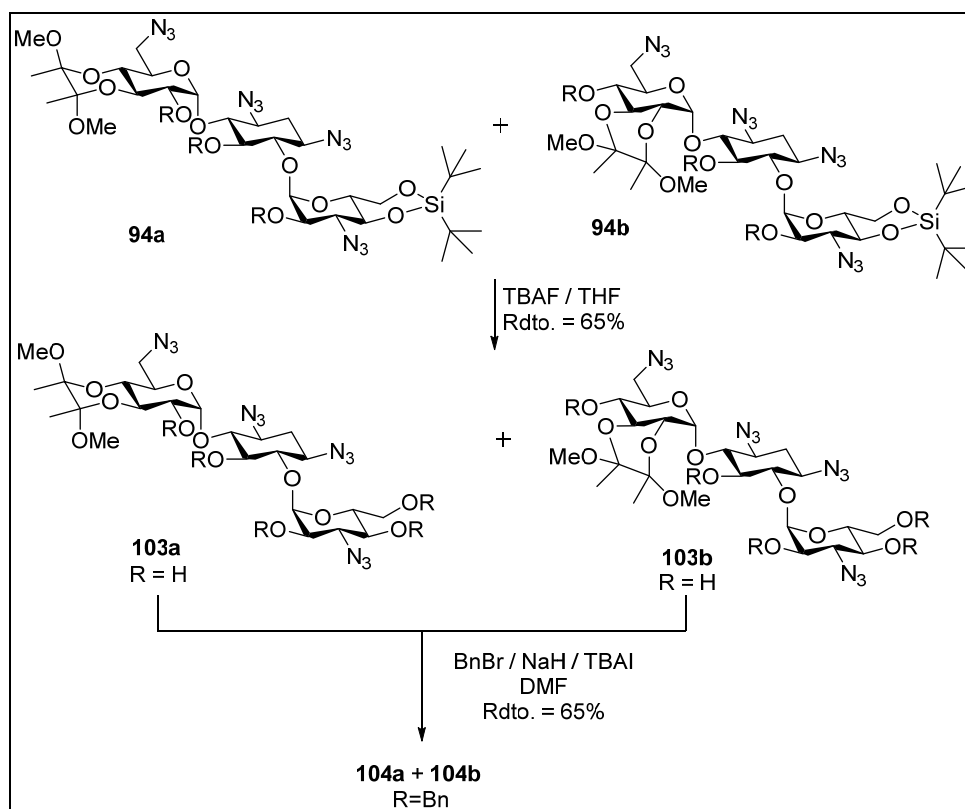
Una vez verificada la utilidad de **83** como farmacóforo en este apartado se recoge la síntesis del trisacárido **84** que, tal como se ha explicado ampliamente en el apartado 4.2.2. combina la estructura clásica de los aminoglicósidos 4,6-disustituidos con algunas variaciones en el anillo I, diseñadas para reducir la toxicidad y la resistencia enzimática. La ruta sintética propuesta para la preparación de **84** se muestra en el esquema 4.17, siendo la etapa clave la glicosilación del fragmento anillo II/III convenientemente preparado con un dador de glicosilo derivado de la 3-desoxi-3-amino-xilosa.

Esquema 4.17. Ruta sintética para la preparación de 84

Aunque para la reacción de glicosilación resultaba posible la utilización de **98** como aceptor de glicosilo, sin embargo, y debido a las dificultades encontradas en su preparación (apartado 4.3.2), consideramos la introducción de algunas modificaciones en la ruta sintética con el objeto de evitarlas.

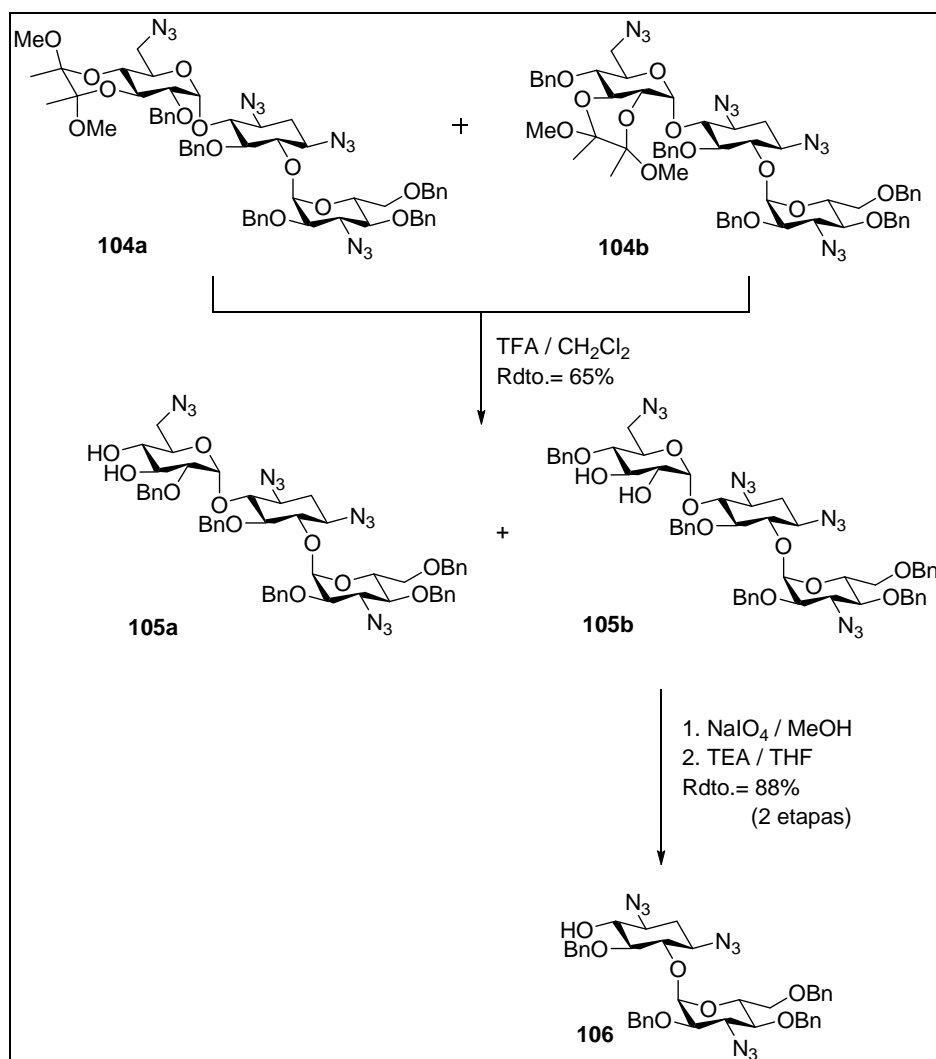
Tal como ha quedado expuesto anteriormente una de las debilidades de la ruta propuesta era la desprotección del acetal del anillo I en presencia del acetal de silicio. Por este motivo, y para evitar este paso, decidimos en la mezcla **94a-94b**, antes de desproteger el anillo I, eliminar el acetal de silicio de ambos derivados. Así, el tratamiento de la mezcla con TBAF en THF dio lugar a los compuestos **103a** y **103b** que no pudieron ser separados (esquema 4.18). Posteriormente la bencilación de los mismos en condiciones estándar, utilizando BnBr como agente bencilante, NaH como base y TBAI como catalizador en DMF condujo a la obtención de **104a** y **104b** con un rendimiento del 42% a partir de **94a** y **94b** (2 etapas). Tampoco en este caso fue posible la separación de ambos productos, ya que aunque se probaron muy diversos sistemas de eluyentes en todos los casos se observaba únicamente una mancha por TLC.

Esquema 4.18. Síntesis de 104a y 104b



El siguiente paso fue la desprotección del anillo I, que se llevó a cabo con TBAF en THF y que dio lugar a los derivados **105a** y **105b**. De estos dos compuestos únicamente fue posible utilizar el derivado **105b** en la reacción de oxidación posterior. Esto se debe a que, tal como ya se ha comentado anteriormente, cuando el diol se encuentra en las posiciones 3'/4' el di-aldehído formado en el proceso de oxidación es lo suficientemente estable como para que se produzca la eliminación del resto del anillo I.

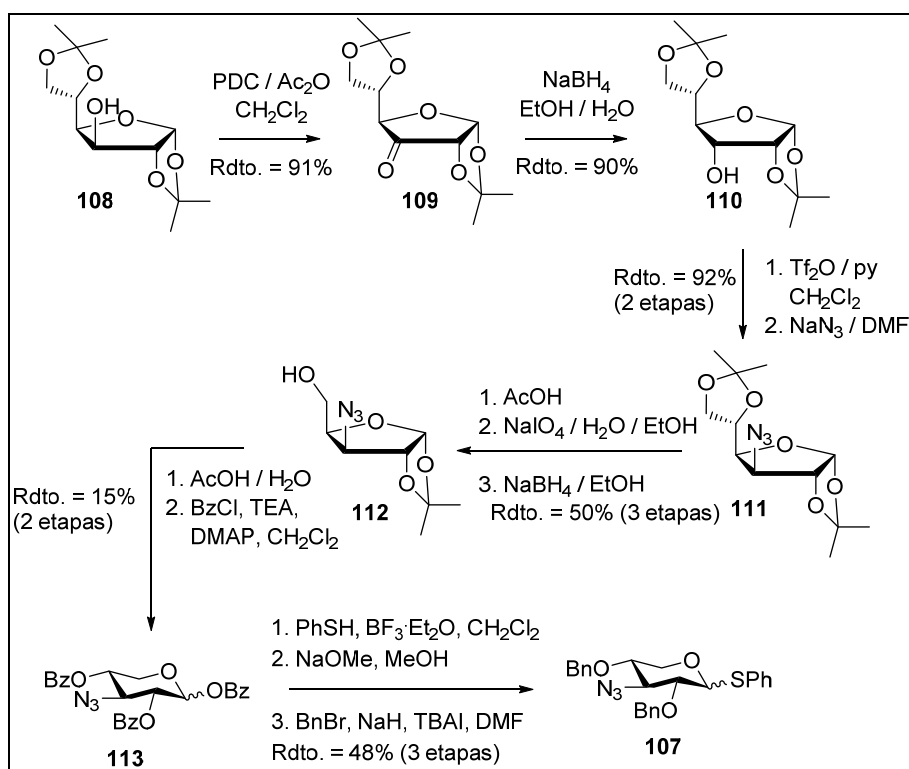
Así, la reacción de **105b** con NaIO₄ en MeOH y posterior tratamiento del di-aldehído intermedio con TEA en THF (esquema 4.19) dio lugar al pseudo-disacárido **106** con un rendimiento global del 8% a partir de la kanamicina A (9 etapas).

Esquema 4.19. Síntesis de 106

Para la síntesis del derivado de la 3-desoxi-3-aminoxilosa convenientemente protegido y activado (**107**) para su utilización como dador de glicosilo en la reacción de glicosilación, nos planteamos inicialmente la ruta sintética que se muestra en el esquema 4.20. Ésta comenzaba con la inversión de la configuración del hidroxilo de la posición C-3 del producto comercial 1,2-5,6-di-isopropiliden-D-glucopiranososa (**108**) a través de un procedimiento de oxidación-reducción. Así el tratamiento de **108** con PDC y anhídrido acético en CH_2Cl_2 y posterior reducción de la cetona resultante (**109**) con $NaBH_4$ permitió la obtención de la 1,2-5,6-di-isopropiliden-D-alopiranososa (**110**). El tratamiento de **110** con anhídrido triflico y piridina en CH_2Cl_2 dio lugar a un triflato intermedio que cuando se hizo reaccionar con NaN_3 en DMF proporcionó la azida **111**. La desprotección del acetal de las posiciones 5',6' de **111** seguido de la ruptura oxidativa del diol resultante por tratamiento con $NaIO_4$, permitió la obtención de un

aldehído que fue inmediatamente reducido con NaBH_4 en EtOH, obteniéndose el derivado **112**. El tratamiento de éste con AcOH en H_2O dio lugar al compuesto 3-desoxi-3-azido-xilosa que fue benzoilado in situ en condiciones estándar (BzCl, TEA, DMAP, CH_2Cl_2) y su posición anomérica activada como un tiofenol mediante el tratamiento con PhSH y $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ en CH_2Cl_2 . Finalmente, se eliminaron los grupos benzoatos con NaOMe en MeOH y los hidroxilos libres fueron protegidos como bencilos utilizando BnBr como agente bencilante, NaH como base, TBAI como catalizador en DMF, obteniéndose el derivado **107** con un rendimiento total del 2.7% en 12 etapas a partir de **108** (esquema 4.20).

Esquema 4.20. Primera ruta para la síntesis de **107**

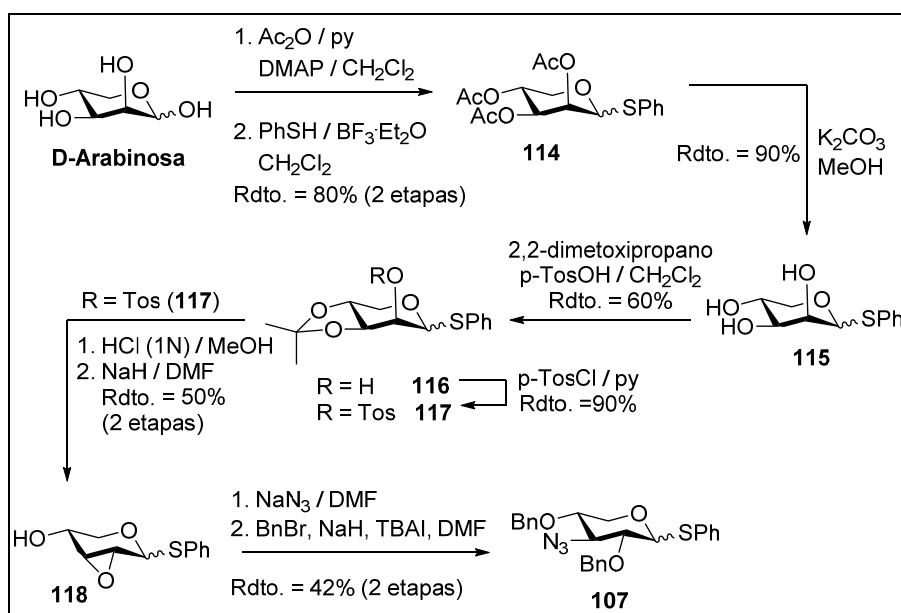


Dado que esta ruta sintética tenía un gran número de etapas y un bajo rendimiento, sobre todo en la formación de la piranosa **113** a partir de la furanosa **112**, diseñamos una ruta alternativa (esquema 4.21), que evitaba esta etapa.

Para ello partimos de la D-arabinosa comercial, cuyo hidroxilo anomérico fue transformado en un tio-fenol a través de una secuencia de dos pasos, acetilación en condiciones estándar e introducción del tio-fenol utilizando idénticas condiciones a las descritas en el caso anterior (PhSH , $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$, CH_2Cl_2), obteniendo el compuesto **114**.

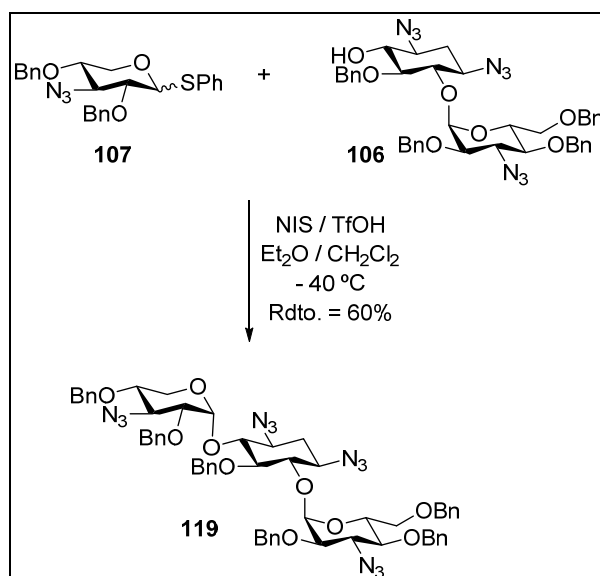
Tras la desprotección de los grupos hidroxilo (**115**), el tratamiento de éste con 1,3-dimetoxipropano, ácido p-TosOH en CH₂Cl₂ dio lugar al derivado **116**. La tosilación de hidroxilo de la posición C-3 con TosCl y piridina en CH₂Cl₂ (**117**), desprotección del acetal en medio ácido y posterior tratamiento con NaH en DMF nos permitió la obtención del epóxido intermedio **118**. Finalmente, se obtuvo el compuesto **107** por apertura de **118** con NaN₃ en DMF y posterior bencilación de los hidroxilos libres con BnBr (esquema 4.21).

Esquema 4.21. Segunda ruta para la síntesis de **107**



Una vez obtenidos el pseudo-disacárido **106** y el dador de glicosilo **107** se procedió a su acoplamiento a través de una reacción de glicosilación, empleando las condiciones descritas por nuestro grupo de investigación para el acoplamiento de la neamina con el dador de glicosilo **107** (NIS, TfOH, Et₂O / CH₂Cl₂ (3:1), -40 °C) (esquema 4.22).¹⁰⁹ En nuestro caso, al utilizar como aceptor de glicosilo **106**, obtuvimos únicamente el trisacárido de configuración α (**119**), no detectándose la presencia del derivado β en el crudo de la reacción.

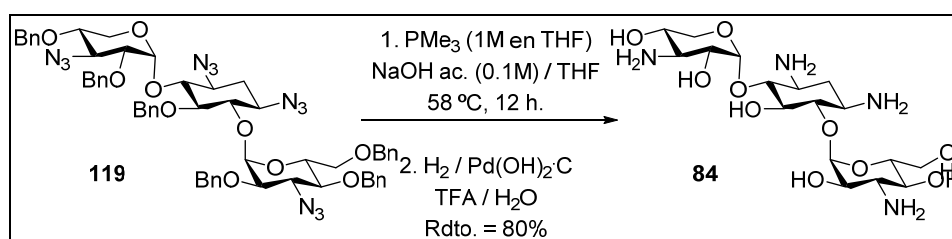
Esquema 4.22. Síntesis de 119



La total estereoselectividad de la reacción fue atribuida a la presencia de un grupo bencilo en la posición 2 del dador de glicosilo **107**, ya que, tal como se ha descrito ampliamente en la bibliografía se trata de un grupo de tipo “no participante” que, en las condiciones adecuadas permite la formación mayoritaria del anómero α .

Finalmente se llevó a cabo la desprotección del compuesto **119** en dos etapas (esquema 4.23).

Esquema 4.23.



El tratamiento de **119** con una disolución de PMe_3 (1M en THF) y con una disolución acuosa 0.1M de NaOH en THF, condiciones clásicas de la reducción de Staudinger, permitió la desprotección de las aminas. La posterior hidrogenación catalítica del derivado obtenido utilizando $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{C}$ como catalizador en una mezcla de H_2O /TFA permitió la obtención del trisacárido **84** con un rendimiento global del 48% a partir del pseudo-disacárido **106** (3 etapas).

4.3.5. Estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” de los compuestos **83** y **84** con enzimas modificadoras de aminoglicósidos.

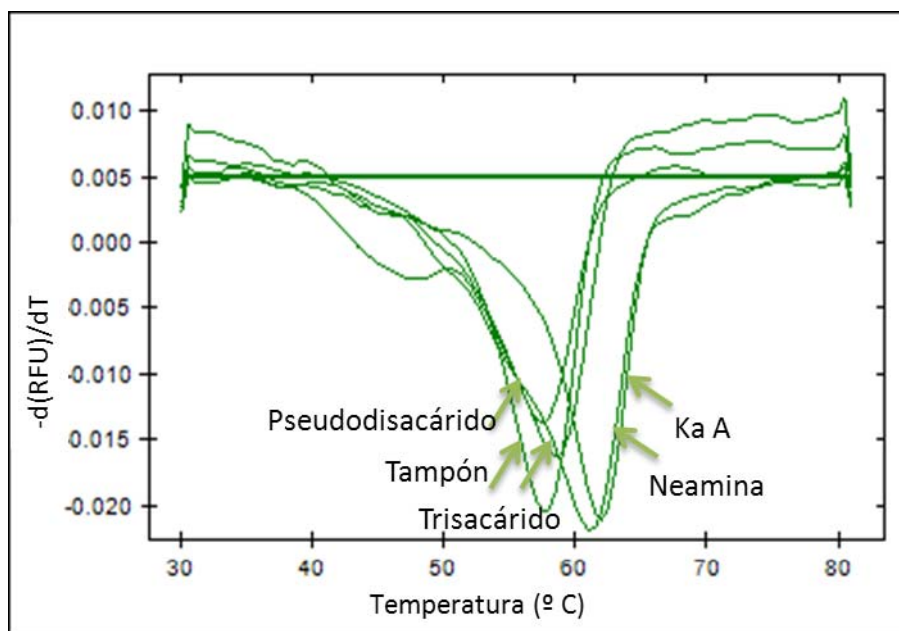
Una vez obtenidos los compuesto **83** y **84** se estudió la capacidad de los mismos como ligandos de las enzimas de resistencia, utilizando como controles el antibiótico kanamicina A y el fragmento neamina (anillos I y II). Dicha afinidad fue evaluada, siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apartado 3.3.2 de esta memoria, mediante el cambio en la temperatura de transición de desnaturalización (ΔT_m) de las enzimas de resistencia (ANT(4'), APH(3') y AAC(6') en presencia de los compuestos en relación a la obtenida en su ausencia. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Valores de T_m de las enzimas de resistencia en presencia y ausencia de kanamicina A, neamina, y sus derivados **83**, **84**.

Enzima	Tampón	Kanamicina	Neamina	83	84
ANT-4'	58±0,1	61,5±0,1	61±0,1	59±0,04	60±0,12
AAC-6'	44±0,09	49±0,1	48±0,2	49±0,11	49±0,10
APH-3'	49±0,09	62±0,1	56±0,2	56±0,09	56±0,11

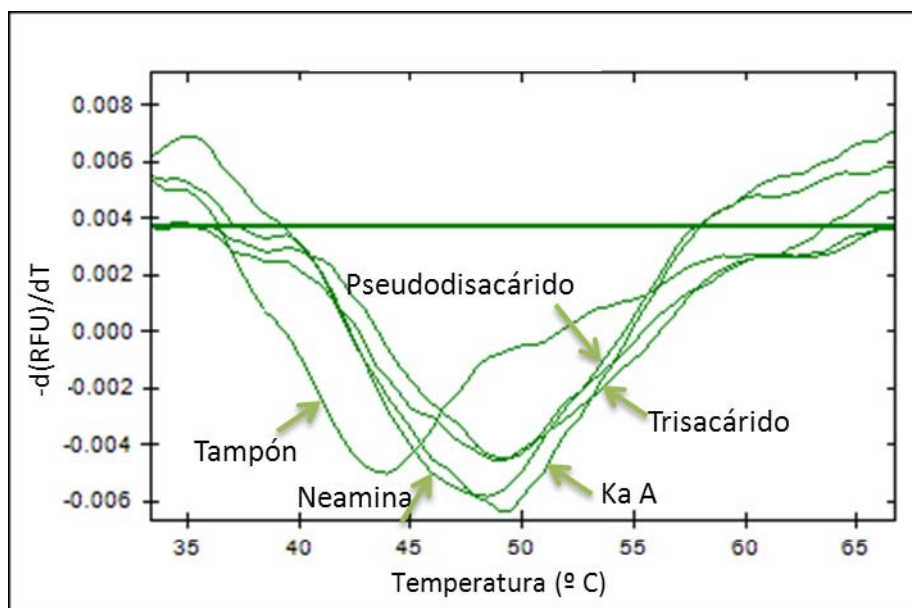
Para el caso de la enzima ANT(4') se observa en la figura 4.12 un incremento de 3.5-3.0°C en la T_m de la proteína en presencia de kanamicina A y neamina. Esto es indicativo de que son buenos ligandos del enzima ya que los estabiliza, mientras que la presencia de los compuestos **83** y **84** incrementa también su T_m , aunque sólo en 1-2 °C lo que indica que son peores ligandos. Este resultado resulta muy positivo, sobre todo para el caso del derivado **84** ya que indica que, tal como habíamos propuesto en nuestra hipótesis de partida, la ausencia del amino de la posición 6' del anillo I disminuye la afinidad del compuesto por este enzima. De este modo si el compuesto **84** mantiene la función antibiótica su inactivación será menor por este enzima con respecto a su antibiótico natural, lo que mejoraría sus propiedades con respecto a la kanamicina A.

Figura 4.12.- Curva de desnaturalización de la enzima ANT(4') de *S. aureus* (5 μ M) sola y en presencia de neamina, kanamicina A, compuesto **83** y **84**.



Para el caso del enzima AAC(6') tanto para su sustrato natural, la kanamicina A, como para el resto de los compuestos el incremento de T_m es muy parecido 4-5 $^{\circ}$ C (figura 4.13). Esto es indicativo de que presentan una afinidad similar al antibiótico natural, siendo además la kanamicina A y la neamina sustratos de la misma. Sin embargo, en el caso de **83** y **84** la inactivación no puede tener lugar debido a la ausencia de grupo amino en la posición 6' del anillo I. Esto implica que si **84** mantiene su actividad antibiótica mejoraría sus propiedades con respecto a la kanamicina A también en este caso.

Figura 4.13.- Curva de desnaturalización de la enzima ACC(6') de *S. aureus* (5 μ M) sola y en presencia de neamina, kanamicina A y de los compuestos **83** y **84**



Finalmente, en el caso de la APH(3') se observa un valor elevado de incremento de la T_m en presencia de su sustrato natural la kanamicina A al igual que con el resto de los compuestos (tabla 4.3). Sin embargo, y al igual que ocurre en el caso del enzima AAC(6') aunque los compuestos **83** y **84** son buenos ligandos no pueden ser sustrato del enzima al no presentar un grupo OH en la posición 3' del anillo I, con lo que de una manera idéntica a la supuesta anteriormente si **84** mantiene su actividad antibiótica, también en este caso se mejorarían las propiedades con respecto a la kanamicina A.

Una vez determinado que los compuestos **83** y **84** eran ligandos de las tres enzimas, llevamos a cabo reacciones enzimáticas de los compuestos con ATP (para el caso de las ANT(4') y la APH(3')) o con acetil-CoA (para el caso de la AAC-6') para ver si eran sustratos o inhibidores de las enzimas. La velocidad de reacción relativa de las diferentes enzimas con la kanamicina A ($V_{rel} = 100\%$) y con los derivados **83** y **84** se recogen en la Tabla 4.4. Estos resultados indican que la neamina es sustrato de las tres familias de enzimas modificadoras pero su velocidad de reacción se reduce a la mitad como era de esperar debido a la falta del anillo III. En el caso de los compuestos **83** y **84** no fueron sustratos de las enzimas APH(3') y AAC(6'), hecho evidente al no presentar los grupos funcionales modificables, hidroxilo y amino, en las posiciones correspondientes (3' y 6' del anillo I).

Sin embargo, en el caso de la ANT(4') se observó reacción para todos los compuestos, incluido el pseudo-disacárido **83**, que no presenta un hidroxilo en la posición 4' del anillo I, hecho que de nuevo indicó la promiscuidad del enzima. A pesar de ello, y tal como habíamos pronosticado, para el trisacárido **84** la velocidad de reacción es muy lenta (solo un 4% formado frente a un 100% de la kanamicina) hecho que de nuevo indica la importancia del grupo metilen-amino en la posición 5' para estabilizar el complejo en el centro catalítico debido a su interacción con los fosfatos del ATP. Por otro lado ninguno de los ligandos ensayados presento actividad inhibitoria con ninguna de las enzimas modificadoras.

Tabla 4.4. Velocidad de reacción relativa (V_{rel} [%]) de los enzimas ANT-4', APH-3'-IIa y AAC-6'-Ib con kanamicina A y el compuesto **84**

Compuestos	ANT-4'	APH-3'-IIa	AAC-6'-Ib
Kanamicina A	100	100	100
Neamina	57	40	45
83	11.4	0	0
84	4.4	0	0

4.3.6. Actividades “*in vivo*” con cepas resistentes y no resistentes a enzimas modificadoras del compuesto **84**

Por último estudiamos si el compuesto diseñado **84** era antibiótico con cepas resistentes y no resistentes. Para ello llevamos a cabo estudios medidas de CIM del compuesto **84** empleando como referencia la kanamicina A y el fragmento **83** (tabla 4.5).

De los datos recogidos en la tabla 4.5 se deduce que, desgraciadamente, el trisacárido **84** no presenta buena actividad antibiótica. Esto puede deberse a que la interacción del grupo amino en 6' del anillo I con la A1408 es importante para mantener su función antibiótica.

Tabla 4.5.- Concentración Inhibitoria Mínima de kanamicina y de los compuestos **83 y **84** frente a cepas bacterianas resistentes y no a enzimas modificadoras de aminoglicósidos.**

<i>Cepas</i>	CIM (µg/mL)		
	<i>Compuestos</i>		
	Kanamicina A	84	83
<i>E. coli</i> /ATCC 2592	4	50	50
<i>E. coli</i> BL21	6	50	50
<i>B. cereus</i> / ATCC 117781	1.5	50	50
<i>S. epidermis</i> / ATCC 1228	>100	>50	100
<i>E. coli</i> (APH3'-IIa)	>200	100	100
<i>E. coli</i> (ANT-4')	>200	>100	>150
<i>E. coli</i> (AAC-6')	>200	100	100

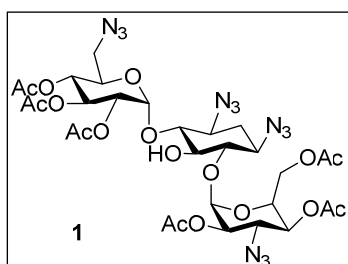
Sin embargo, el derivado **84** puede resultar un compuesto muy interesante para utilizarlo como punto de partida para el diseño de inhibidores y/o aceptores trampa de estas enzimas modificadoras de aminoglicósidos, al ser ligando de las mismas. Por otro lado, resultaría necesario estudiar su afinidad con el ARNr 18S eucariota, ya que si presenta poca o nula afinidad por el mismo también resultaría interesante como punto de partida para el diseño de nuevos antibióticos con menor toxicidad.

4.4.- Parte experimental

4.4.1. Síntesis de 6-O-(3-desoxi- α -D-3-amino-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina, 83.

4.4.1.1.- 2',3',4',2'',4'',6''-O-hexa-acetil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, 1

Preparación de la disolución de trifluorometansulfonil azida (TfN_3). Sobre una disolución de NaN_3 (3.33 g, 51.2 mmol) en H_2O (8.5 mL) se adicionó tolueno (8.5 mL) bajo atmósfera de argón. La mezcla bifásica se enfrió a 0 °C y posteriormente se adicionó Tf_2O gota a gota (5.5 mL, 33.4 mmol) manteniendo una agitación vigorosa a dicha temperatura durante 30 min. A continuación se dejó que subiera la temperatura lentamente hasta t.a. a la cual se mantuvo en agitación durante 2 h. Transcurrido este tiempo la mezcla se neutralizó con una disolución acuosa de NaHCO_3 saturada hasta pH= 7. Finalmente la fase acuosa se separó y se extrajo dos veces más con la misma cantidad de tolueno (2 x 8.5 mL), obteniéndose una disolución 2M de TfN_3 que fue empleada directamente en la reacción de diazotransferencia.



Sobre una disolución de kanamicina-A en su estado de base libre (1.35 g, 2.8 mmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (7 mg, 0.028 mmol) en H_2O (8.2 mL) se adicionó NaHCO_3 (0.94 g, 11.2 mmol). Posteriormente, sobre la mezcla a t.a. manteniendo una agitación vigorosa se añadió la disolución de TfN_3 recién preparada y una mezcla de MeOH/piridina (1:1 v/v) hasta la obtención de una fase homogénea. La mezcla se agitó aproximadamente durante 72 h. bajo Ar a t.a., tras las cuales se eliminó el disolvente a presión reducida.

Con objeto de facilitar la purificación del compuesto se decidió aislarlo como derivado per-acetilado. Para ello el residuo obtenido fue disuelto en piridina (20 mL), se adicionó Ac_2O (10 mL) y DMAP en cantidad catalítica (14 mg, 0.11 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante toda la noche. Tras comprobar la desaparición del producto de partida por TLC (hexano:AcOEt 1:1), la reacción se detuvo adicionando una disolución acuosa 1M de HCl. Posteriormente se extrajo con AcOEt (2 x 150 mL) y la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa 1M de HCl, con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y con una disolución acuosa saturada de NaCl. Finalmente se secó sobre NaSO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó por

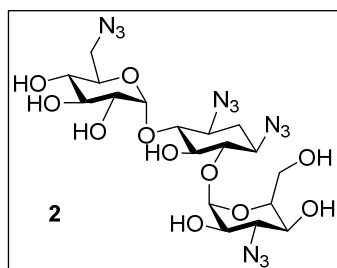
cromatografía en columna de gel de sílice (hexano:AcOEt, 6:4), obteniéndose el compuesto **1** (1.45 g, 60%) como una espuma blanca.

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 5.47 (m, 2H), 5.33 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.05 (dd, $J = 9.9$, 9.9 Hz, 1H), 4.95-4.89 (m, 2H), 4.78 (dd, $J = 10.5$, 3.7 Hz, 1H), 4.33 (ddd, $J = 9.4$, 5.3, 2.6 Hz, 1H), 4.28 (ddd, $J = 9.9$, 3.7, 3.7 Hz, 1H), 4.13-4.06 (m, 2H), 4.09 (dd, $J = 10.5$ Hz, 1H), 3.57 (ddd, $J = 9.4$, 9.4, 3.1 Hz, 1H), 3.50-3.44 (m, 2H), 3.42-3.29 (m, 5H), 2.28 (ddd, $J = 13.1$, 4.4, 4.4 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H, COCH_3), 2.13 (s, 3H, COCH_3), 2.08 (s, 3H, COCH_3), 2.05 (s, 6H, 2COCH_3), 2.02 (s, 3H, COCH_3), 1.57 (ddd, $J = 12.7$, 12.7, 12.7 Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 170.3, 170.1, 170.0, 169.9, 169.8, 169.7, 98.0, 97.3, 85.6, 82.1, 74.0, 71.9, 71.1, 69.9, 69.2, 68.3, 68.1, 67.6, 63.0, 61.2, 60.5, 58.7, 51.5, 32.6, 20.8, 20.7, 20.6, 20.4, 20.2, 20.1.

MS-API-ES: 843 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

4.4.1.2.- 1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **2**



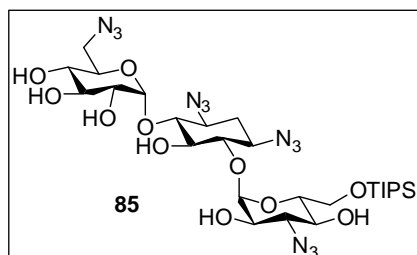
Sobre una disolución del compuesto **1** (1.45 g, 1.72 mmol) en THF (54 mL) a 0 °C se adicionó gota a gota una disolución 1M de CH_3ONa en MeOH (17.2 mL, 17.2 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 8 h., tras las cuales se neutralizó con resina Amberlita® IRA-120 (H^+). Posteriormente se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. Finalmente, el residuo fue purificado en columna de cromatografía de gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1), obteniendo el derivado **2** como un sólido blanco (0.91 g, 90%).

^1H RMN ($\text{MeOD}-d_4$, 400 MHz) δ : 5.24 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 5.18 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 4.08-3.98 (m, 2H), 3.78-3.28 (m, 15H), 2.33 (dt, $J = 12.6$ Hz, 4.2 1H), 1.56 (q, $J = 12.4$ Hz, 1H).

^{13}C RMN ($\text{MeOD}-d_4$, 100 MHz) δ : 100.4, 98.0, 83.0, 80.2, 73.8, 72.9, 71.9, 71.5, 70.4, 70.1, 67.9, 66.4, 60.0, 58.8, 50.8, 31.5.

MS-API-ES: 589 ($\text{M}+1$) $^+$.

4.4.1.3. - 6''-O-triisopropil-silil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **85**



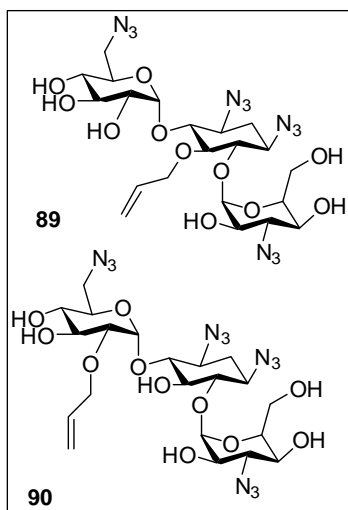
Sobre una disolución del compuesto **2** (0.32 g, 0.54 mmol) en THF anhidro (8.5 mL) se añadió 2,6-lutidina (0.12 mL, 0.98 mmol) manteniendo la mezcla de reacción a 0° C. Tras 10 min, se añadió gota a gota TIPS-TfO (0.17 mL, 0.65 mmol). La

reacción se dejó en agitación durante 15 min después de las cuales se controló por TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) el transcurso de la reacción. Cuando se observó la desaparición del producto de partida se añadió MeOH (2 mL) y la mezcla se dejó agitando durante 10 min adicionales. La eliminación del disolvente a presión reducida dio lugar a un crudo, el cual se purificó por columna de gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH, 9:1) obteniendo el compuesto **85** como un aceite incoloro (0.26 g, 65%).

¹H RMN (MeOD-*d*₄, 400 MHz) δ: 5.25 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 5.23 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.18 (dt, *J* = 10.9, 2.1 Hz, 1H), 4.19-4.00 (m, 1H), 3.93-3.85 (m, 2H), 3.65-3.28 (m, 13H), 2.35 (dt, *J* = 11.6, 3.8 Hz, 1H), 1.45 (q, *J* = 11.8 Hz, 1H), 1.18-1.00 (m, 21H).

MS-API-ES: 841 (M+H)⁺.

4.4.1.4.- 5-O-Alil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A y 2'-O-Alil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **89** y **90**.



Sobre una disolución del compuesto **1** (1.45 g, 1.74 mmol) en DMF (17.4 mL) a 0 °C se adicionó gota a gota yoduro de alilo (0.48 mL, 5.22 mmol) y se dejó agitando durante 15 min, posteriormente se añadió NaH al 90% (0.024 g). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante 30 min, tras los cuales se añadió una disolución acuosa 1M de NH₄Cl (2 mL) y se concentró a presión reducida. Finalmente, el crudo fue purificado en columna de gel de sílice (hexano/AcOEt, 6:4), obteniendo la mezcla de compuestos **88a** y **88b** como un sólido blanco (0.91 g, 50%). MS-API-

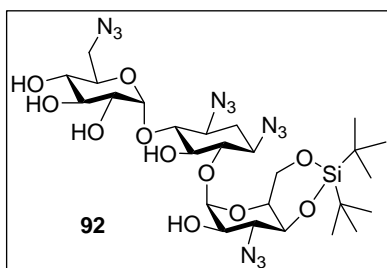
ES: 882 (M+H)⁺ (**88a** y **88b**). Posteriormente esa mezcla (0.91 g, 1.03 mmol) se disolvió en MeOH (11.6 mL) y se añadió una disolución de MeONa 1M en MeOH (10.4 mL, 10.4 mmol). La reacción se mantuvo en agitación durante una noche, tras la

cual la se neutralizó con resina Amberlita® IRA-120(H⁺), se filtró y se concentró a presión reducida. La cromatografía en columna de gel de sílice permitió la obtención de **89** (0.14 g, 13%) como un sólido blanco y de **90** (0.10 g, 10%) como un sólido esponjoso.

89: ¹H RMN (MeOD-*d*₄, 400 MHz) δ: 5.87 (ddt, *J* = 17.3, 10.4, 6.0 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.23 (dq, *J* = 17.3, 1.6 Hz, 1H), 5.13-5.11 (m, 1H), 5.09 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.18 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.17 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H), 4.02 (ddd, *J* = 10.4, 4.3, 2.7 Hz, 1H), 3.69-3.64 (m, 1H), 3.63 (dd, *J* = 3.9, 2.7 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.60-3.55 (m, 4H), 3.52 (dd, *J* = 6.2, 3.0 Hz, 1H), 3.38 (dd, *J* = 4.0, 3.1 Hz, 1H), 3.36-3.25 (m, 5H), 3.23 (dd, *J* = 2.4, 1.4 Hz, 1H), 2.28 (dt, *J* = 12.9, 4.3 Hz, 1H), 1.46 (q, *J* = 12.9 Hz, 1H); ¹³C RMN (MeOD-*d*₄, 100 MHz) δ: 134.5, 117.3, 98.6 (2C), 82.2, 81.0, 79.3, 74.5, 72.6, 72.2 (2C), 72.0, 71.7, 71.0, 68.3, 67.1, 60.7, 60.6, 59.2, 51.3, 31.9; MS-API-ES: 651 (M+Na)⁺.

90: ¹H RMN (MeOD-*d*₄, 400 MHz) δ: 5.90 (ddt, *J* = 17.2, 10.4, 5.7 Hz, 1H), 5.29 (q, *J* = 1.6 Hz, 1H), 5.25- 5.23 (m, 1H), 5.18 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 5.12 (q, *J* = 1.4 Hz, 1H), 5.10 (q, *J* = 1.4 Hz, 1H), 4.22 (dt, *J* = 5.8, 1.4 Hz, 1H), 4.19 (dt, *J* = 5.8, 1.4 Hz, 1H), 4.09 (dt, *J* = 5.7, 1.4 Hz, 1H), 4.06 (dt, *J* = 5.7, 1.4 Hz, 1H), 4.05 - 4.02 (m, 1H), 4.01 (dd, *J* = 4.5, 2.5 Hz, 1H), 4.00-3.92 (m, 12H), 2.27 (dt, *J* = 12.8, 4.4 Hz, 1H), 1.47 (q, *J* = 12.3 Hz, 1H); ¹³C RMN (MeOD-*d*₄, 100 MHz) δ: 134.5, 126.2, 107.1, 96.2, 83.3, 81.2, 77.8, 74.6, 73.4, 72.4, 71.9 (2C), 71.5 (2C), 70.7 (2C), 65.6, 60.5, 59.5, 51.4, 31.7; MS-API-ES: MS-API-ES: 651 (M+Na)⁺.

4.4.1.5.- 4'',6''-O,O-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **92**



Sobre una disolución de **2** (0.91 g, 1.55 mmol) y DMAP (0.094 g, 0.77 mmol) en piridina (3 mL) enfriada a -10 °C se adicionó gota a gota (tBu)₂-Si(OTf)₂ (0.95 g, 2.17 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min a esta temperatura y posteriormente a t.a. durante 24 h.

Transcurrido ese tiempo la reacción se paró con unas gotas de MeOH y el disolvente fue eliminado a presión reducida. Sobre el residuo se añadió una disolución acuosa saturada de NaCl (100 mL) y AcOEt (100 mL). Posteriormente se separaron las fases y la acuosa se extrajo con AcOEt (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y

se concentró. La mezcla fue purificada en columna de cromatografía en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) obteniendo el derivado **92** (0.90 g, 80%) como un sólido blanco.

^1H RMN ($\text{MeOD}-d_4$, 300 MHz) δ : 5.21 (d, $J = 3.5$ Hz, 2H, H-anom.), 4.53 (ddd, $J = 5.1, 9.6, 9.6$ Hz, 1H), 4.16-4.00 (m, 2H), 3.83-3.30 (m, 14H), 2.40 (ddd, $J = 8.5, 4.0, 4.0$ Hz, 1H), 1.59 (ddd, $J = 12.3, 12.3, 12.3$ Hz, 1H, H-2 DOS), 1.20 (dd, $J = 7.0, 7.0$ Hz, 1H), 1.08 (s, 9H, Si), 1.03 (s, 9H, Si).

^{13}C RMN ($\text{MeOD}-d_4$, 75 MHz) δ : 102.9, 99.5, 86.1, 81.0, 78.4, 75.4, 74.8, 73.8, 73.4, 72.2, 71.6, 67.8, 67.6, 62.1, 60.6, 52.9, 33.3, 27.9, 27.8, 27.5, 23.4, 20.9.

MS-API-ES: 751.3 (M+Na).

4.4.1.6.- 3'-4'-O,O-(2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-4'',6''-O,O-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A y 2'-3'-O,O-(2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-4'',6''-O,O-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **94a** y **94b**

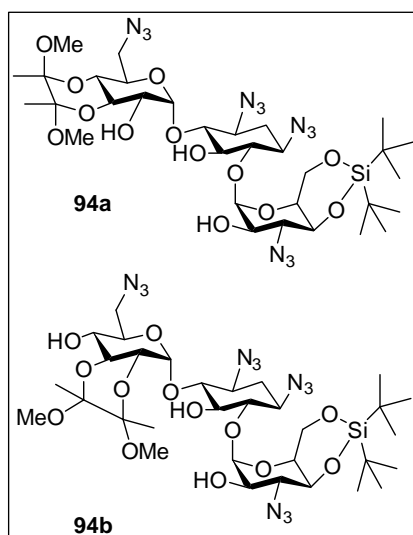
Preparación del reactivo 2,2,3,3-Tetrametoxibutano (TMB, **93**).

Sobre una disolución de 2,3-butanodiona (6.8 mL, 77.5 mmol) y trimetilortoformiato (20 mL, 183 mmol) en MeOH (100 mL) se adicionó ácido sulfúrico (2 gotas). La solución resultante se calentó a reflujo durante 20 h. bajo argón, tiempo durante el cual la solución se volvió de color marrón oscuro. La mezcla se enfrió hasta t.a. y sobre ella se añadió NaHCO_3 (2.20 g). Posteriormente la mezcla se concentró, obteniendo un líquido de color naranja que fue diluido con Et_2O (200 mL). La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniendo un líquido de color amarillo claro. Éste fue purificado mediante destilación fraccionada (p.e. 32-33 °C (0.8 mmHg); p.e. 172-174 °C (760 mmHg)), obteniendo **93** como un líquido incoloro (7.3 g, 53%)

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 3.31 (s, 12 H), 1.32 (s, 6 H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ : 103.0, 49.3, 19.0.

MS-API-ES: 201.1 (M+Na)⁺.

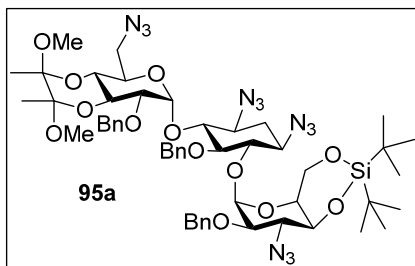


Sobre una disolución del compuesto **92** (0.90 g, 1.24 mmol) en MeOH (9 mL) se añadió **93** (0.44 g, 2.5 mmol), trimetil-ortoformiato (0.54 mL, 5.0 mmol), 2,3-butanodiona (0.12 mL, 1.37 mmol) y como catalizador *p*-TosOH (31 mg, 0.18 mmol). La mezcla se calentó a reflujo bajo argón 18 h. Transcurrido ese tiempo la mezcla se enfrió hasta t.a. y se trató con NaHCO₃ (aprox. 0.3 g) y se concentró a presión reducida. El crudo de la reacción se diluyó con NaCl acuoso saturado (100 mL) y se extrajo con AcOEt (2 x 100 mL). La purificación se realizó por cromatografía en columna en gel de sílice usando como eluyente (hexano/AcOEt, 6:4), obteniendo **94a** (0.40 g, 39%) como un sólido amorfo y **94b** (0.40 g, 39%) como un sólido blanco.

94a: ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5.18 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-anom), 5.09 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-anom.), 4.75 (sa, 1H, H-OH), 4.26 (ddd, *J* = 10.0, 10.0, 5.0 Hz, 1H), 4.17 (ddd, *J* = 10.0, 3.9, 2.5 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 9.9, 5.0 Hz, 1H), 3.98 (dd, *J* = 9.9, 9.9 Hz, 1H), 3.86 (dd, *J* = 3.5, 10.1 Hz, 1H), 3.83-3.31 (m, 12H), 3.29 (s, 3H, MeO), 3.27 (s, 3H, MeO), 3.14 (sa, 1H, H-OH), 2.70 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-OH), 2.43 (ddd, *J* = 13.2, 4.4, 4.4 Hz, 1H, H-2-DOS), 1.59 (ddd, *J* = 12.5, 12.5, 12.5 Hz, 1H), 1.34 (s, 3H, CH₃-acetal), 1.34 (s, 3H, CH₃-acetal), 1.05 (s, 9H, t-Bu-Si), 0.97 (s, 9H, t-Bu-Si); ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 101.5, 99.8, 99.7, 98.5, 85.6, 81.2, 76.8, 74.0, 70.5, 70.4, 70.0, 69.4, 67.1, 66.4, 66.3, 65.9, 59.6, 59.1, 50.1, 48.1, 48.0, 32.0, 27.3 (3C), 26.9 (3C), 22.6 (2C), 17.7, 17.6; MS-API-ES: 865 (M+Na)⁺.

94b: ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5.06 (d, *J* = 3.7 Hz, 2H, H-anom.), 4.51 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.20 (ddd, *J* = 10.1, 10.1, 5.0 Hz, 1H), 4.07 (dd, *J* = 5.6, 4.2 Hz, 1H), 4.04-3.96 (m, 2H), 3.88-3.72 (m, 4H), 3.69-3.29 (m, 9H), 3.28 (s, 3H, MeO), 3.26 (s, 3H, MeO), 2.62 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-OH), 2.43 (ddd, *J* = 8.3, 3.6, 3.6 Hz, 1H), 2.36 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-OH), 1.56 (ddd, *J* = 12.4, 12.4, 12.4 Hz, 1H, H-2-DOS), 1.34 (s, 6H, CH₃-acetal), 1.31 (s, 3H, CH₃-acetal), 1.06 (s, 9H, t-Bu-Si), 1.00 (s, 9H, t-Bu-Si); ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 100.9, 100.4, 99.6, 99.3, 87.3, 85.6, 81.9, 77.2, 73.4, 72.8, 70.6, 68.8, 68.7, 68.1, 67.1, 66.9, 66.7, 66.4, 59.9, 48.4, 48.1, 32.2, 27.4 (3C), 26.9 (3C), 22.7 (2C), 17.7, 17.6; MS-API-ES: 865 (M+Na)⁺.

4.4.1.7.- 5,2',3''-O-tri-bencil-3'-4'- O,O- (2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-4'',6''- O,O-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **95a**



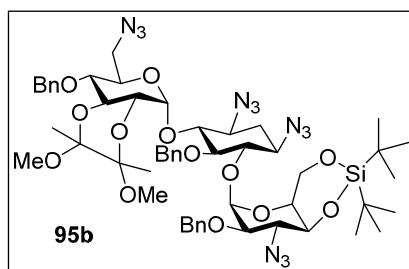
Sobre una disolución de **94a** (0.40 mg, 0.38 mmol) y TBAI (0.005 g, 0.14 mmol) en DMF anhidra (1.9 mL) a 0 °C se adicionó NaH al 60% (0.10 g, 2.85 mmol). La mezcla obtenida se agitó durante 10 min bajo Ar a esa temperatura. Posteriormente se adicionó gota a gota BnBr (0.27 mL, 2.24 mmol) y la mezcla se agitó a t.a. durante 24 h. Pasado este tiempo, se paró la reacción con la adición de MeOH (1.5 mL) y se llevó a sequedad. Sobre el crudo de la reacción se añadió una disolución acuosa saturada de NaCl y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 25 mL), se secó con NaSO₄ anhidro y se filtró. Finalmente, se eliminó el disolvente co-evaporando con tolueno. El crudo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice usando como eluyente (hexano/AcOEt, 95:5), obteniendo el compuesto **95a** (0.28 g, 65%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.50-6.94 (m, 15H, Ar), 5.31 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H-anom.), 5.25 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, CH₂-Ar), 5.12 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-anom.), 4.95 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.80 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.78 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.62 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.59 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.27 (ddd, *J* = 9.8, 4.4, 3.2 Hz, 1H), 4.10 (dd, *J* = 10.4, 9.1 Hz, 1H), 3.88 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.84 (dd, *J* = 10.0, 9.4 Hz, 1H), 3.78 (dd, *J* = 5.6, 5.0 Hz, 1H), 3.56-3.53 (m, 5H), 3.50 (m, 2H), 3.46-3.44 (m, 1H), 3.42 (dd, *J* = 3.9, 3.7 Hz, 1H), 3.32-3.25 (m, 2H), 3.22 (s, 6H, -OMe), 3.20-3.12 (m, 1H), 2.30 (dt, *J* = 13.2, 4.5 Hz, 1H, H-2-DOS), 1.46 (q, *J* = 13.2 Hz, 1H, H-2-DOS), 1.23 (s, 3H, CH₃-acetal), 1.09 (s, 3H, CH₃-acetal), 0.99 (s, 9H, t-Bu-Si), 0.89 (s, 9H, t-Bu-Si).

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 139.1, 138.5, 138.1, 128.7 (2C), 128.6 (3C), 128.4 (3C), 128.3 (2C), 128.0 (2C), 126.8, 126.0, 125.2, 99.7, 99.3, 98.2, 97.4, 83.8, 82.3, 78.8, 78.1, 75.6, 75.1, 74.4, 74.2, 71.1, 70.2, 68.0, 67.9, 66.7, 64.9, 59.7 (2C), 58.9, 51.6, 48.1, 47.4, 32.2, 27.7 (3C), 26.9 (3C), 20.1, 18.0, 17.9, 17.5.

MS-API-ES: 1135 (M+Na)⁺.

4.4.1.8.- 5,4',3''-O-tri-bencil-2'-3'- O,O- (2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-4'',6''- O,O-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **95b**



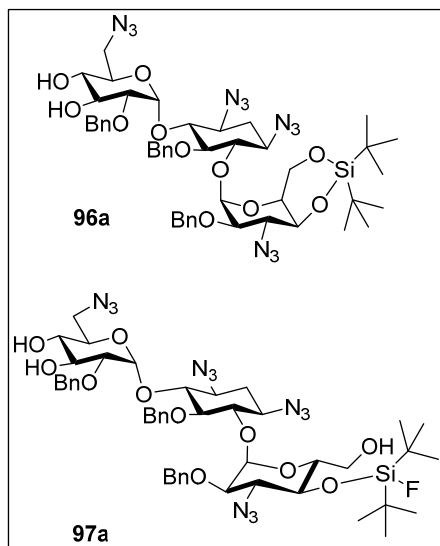
La síntesis del compuesto **95b** se llevó a cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apartado 4.4.1.5. a partir del derivado **94b** (0.40 g, 0.47 mmol). La cromatografía en columna de gel de sílice del crudo de reacción permitió la obtención de **95b** (0.36 g, 70%).

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.45-7.00 (m, 15H, Ar), 5.46 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-anom.), 5.22 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-anom.), 5.04 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.81 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.76 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.66 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.63 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.36 (dd, *J* = 4.8, 2.4 Hz, 1H), 4.34 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.14 (t, *J* = 10.1 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 10.2, 5.3 Hz, 1H), 3.80 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 10.0, 2.5 Hz, 1H), 3.61-3.56 (m, 1H), 3.55 -3.53 (m, 1H), 3.50-3.45 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.38 (dd, *J* = 6.7, 3.8 Hz, 1H), 3.32-3.26 (m, 2H), 3.24 (s, 3H, -OMe), 3.25 (s, 3H, -OMe), 3.20-3.17 (m, 2H), 3.16 (dd, *J* = 10.3, 3.5 Hz, 1H), 2.40-2.38 (m, 1H, H-2-DOS), 1.65-1.51 (m, 1H, H-2-DOS), 1.29 (s, 6H, CH₃-acetal), 1.02 (s, 9H, t-Bu-Si), 0.89 (s, 9H, t-Bu-Si),

¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 138.4 (2C), 138.1, 129.2, 128.7 (2C), 128.4 (2C), 128.3 (2C), 128.1 (2C), 127.9 (2C), 127.7, 127.3, 126.4 (2C), 99.8, 99.6, 98.2, 97.4, 84.0, 81.4, 78.4, 77.1, 76.5, 74.4, 74.1, 73.9, 70.1, 69.4, 68.1, 67.6, 66.7, 64.7, 59.2, 50.6 (2C), 48.3, 48.2 (2C), 32.2, 31.7, 28.5, 27.6 (3C), 27.0 (3C), 22.8, 20.0.

MS-API-ES: 1135 (M+Na)⁺.

4.4.1.9.- 5,2',3''- O-tri-bencil-4'', 6''- O,O-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A y de 5,2',3''- O-tri-bencil-4''-O-di-terc-butil-fluoro-silil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **96a** y **97a**



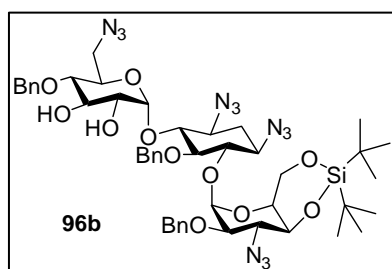
Sobre una disolución del compuesto **95a** (0.25 g, 0.22 mmol) en CH₂Cl₂ (2.3 mL) se añadió TFA y H₂O (1 mL, 10:1 v/v). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 40min. Transcurrido este tiempo se añadió cuidadosamente una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con AcOEt (2 x 25 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. La cromatografía en columna en gel de sílice del crudo empleando como eluyente (hexano/AcOEt 7:3), dio lugar a los compuestos **96a** (0.13 g, 60%) como un sólido blanco y **97a** (0.04 g, 20%) como un aceite incoloro.

96a: ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.50-7.17 (m, 15H, Ar), 5.41 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, H-anom.), 5.36 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H-anom.), 5.01 (d, *J* = 10.7, 1H, CH₂-Ar), 4.95 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.84 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.67 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.61 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.22 (ddd, 1H, *J* = 10.0, 5.3, 2.4 Hz), 3.96-3.88 (m, 3H), 3.85 (dd, *J* = 10.0, 8.9 Hz, 1H), 3.67 (m, 3H), 3.64-3.62 (m, 4H), 3.57-3.55 (m, 2H), 3.42 (dd, *J* = 13.2, 2.4 Hz, 1H), 3.33-3.31 (m, 3H), 2.26 (dt, *J* = 12.7, 4.2 Hz, 1H, H-2-DOS), 1.37-1.35 (m, 1H, H-2-DOS), 1.03 (s, 9H, t-Bu-Si), 0.92 (s, 9H, t-Bu-Si). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ: 138.7, 138.5, 138.3, 128.3 (2C), 128.2 (2C), 128.1 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8 (2C), 127.2 (2C), 127.1, 97.8, 97.4, 83.6, 81.5, 78.8, 78.7, 77.0, 76.9, 74.5, 74.2, 73.8, 73.2, 70.9, 67.7, 66.4, 65.0, 64.7, 59.8, 59.6, 51.3, 32.8, 31.9 (2C), 26.7 (3C), 26.2 (3C). MS-API-ES: = 999 (M+H)⁺.

97a: ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.45-7.08 (m, 15H), 5.51 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, -anom.), 5.29 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, -anom.), 4.88 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.74 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.70 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.67 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.59 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.42 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, CH₂-Ar), 4.20 (ddd, *J* = 9.9, 5.3, 2.4 Hz, 1H), 3.93 (dt, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 3.83-3.80 (m, 4H), 3.75 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H), 3.67 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.65-3.62 (m, 2H), 3.61-3.55 (m, 2H), 3.52

(dd, $J = 13.2, 2.4$ Hz, 1H), 3.39 (dd, $J = 13.2, 5.9$ Hz, 1H), 3.25 (dd, $J = 10.1, 4.6$ Hz, 1H), 3.26 (m, 1H), 3.18 (dd, $J = 9.8, 3.8$ Hz, 1H), 2.27 (dt, $J = 12.3, 4.5$ Hz, 1H, H-2-DOS), 1.45 (q, $J = 12.3$ Hz, 1H, H-2-DOS), 0.88 (s, 9H), 0.99 (s, 9H). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 138.4, 138.3, 138.3, 128.3 (2C), 128.2 (2C), 128.1 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8, 127.5, 127.2 (2C), 127.1, 97.8, 97.5, 83.9, 78.7, 78.6, 77.0, 76.8, 74.5, 74.1, 73.8, 73.2, 72.2, 70.9, 67.6, 66.6, 64.9, 59.8, 59.6, 51.7, 46.8, 31.9, 26.7, 26.3, 22.3(3C), 19.5(3C). MS-API-ES: 1041 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

4.4.1.10.- 5,4',3''- *O*-tri-bencil-4'', 6''- *O,O*-di-terc-butil-silan-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **96b**



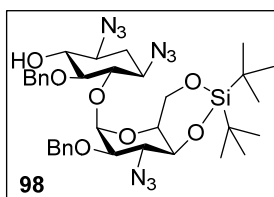
La síntesis del compuesto **96b** se llevó a cabo siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apartado 4.4.1.6. a partir del derivado **95b** (0.36 g, 0.32 mmol). La cromatografía en columna de gel de sílice del crudo de reacción permitió la obtención de **96b** (0.27 g, 85%).

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.44-7.17 (m, 15H), 5.39 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, -anom.), 5.34 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 5.00 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.93 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.82 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.66 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.59 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 4.20 (ddd, $J = 9.9, 5.3, 2.4$ Hz, 1H), 3.93-3.91 (m, 2H), 3.89 (m, 1H), 3.82 (dd, $J = 9.8, 8.9$ Hz, 1H), 3.69 (t, $J = 9.4$ Hz, 1H), 3.65 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 3.58 (ddd, $J = 9.4, 5.6, 3.2$ Hz, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.42 (dd, $J = 13.3$ Hz, 1H), 3.32 (ddd, $J = 5.7, 3.0, 1.3$ Hz, 1H), 3.28 (m, 1H), 2.24 (dt, $J = 12.5, 4.0$ Hz, 1H, H-2-DOS), 1.36 (q, $J = 12.5$ Hz, 1H, H-2-DOS), 1.02 (s, 9H), 0.89 (s, 9H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 138.6, 138.5, 138.3, 128.3 (2C), 128.2 (2C), 128.1 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8, 127.5, 127.2 (2C), 127.1, 97.8, 97.5, 83.9, 78.7, 78.6, 77.0, 76.8, 74.5, 74.1, 73.8, 73.2, 72.2, 70.9, 67.6, 66.6, 64.9, 59.8, 59.6, 51.7, 46.8, 31.9, 26.7 (3C), 26.3 (3C), 22.3, 19.5.

MS-API-ES: = 999 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

4.4.1.11.- 1,3-Diazido-5-O-bencil-6-O-(3-desoxi-3-azido-2-O-bencil-4,6-O,O-di-terc-butil-silan- α -D-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina, **98**



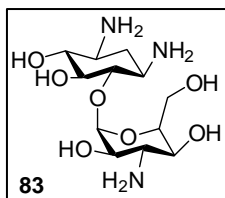
Sobre una disolución del compuesto **96b** (0.27 g, 0.27 mmol) en MeOH (8.8 mL) a 0 °C se añadió NaIO₄ (0.10 g, 0.52 mmol). La mezcla resultante se dejó agitando a t.a. durante 24 h, transcurridas las cuales la reacción se filtró a vacío sobre Celite®. El sólido se lavó con AcOEt (2 x 50mL). Finalmente el combinado de fases orgánicas se concentró a presión reducida. El residuo así obtenido se disolvió en THF (6.6 mL) y se añadió TEA (110 μ L, 0.79 mmol) gota a gota. La mezcla se agitó bajo Ar durante 16h a t.a. y se concentró a vacío. El residuo se purificó por columna cromatografía en gel de sílice (hexano/AcOEt 9:1) para dar el compuesto **98** (0.17 g, 88%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ : 7.44-7.28 (10H, m), 5.43 (1H, d, J = 3.8 Hz, H-1''), 5.0 (1H, d, J = 11.8 Hz, Bn), 4.81 (1H, d, J = 12.0, Hz, Bn), 4.68 (1H, d, J = 11.2 Hz, Bn), 4.10 (1H, dd, J = 10.0, 5.1Hz, H-6''), 4.03 (1H, ddd, J = 9.9, 9.9, 5.1Hz-5''), 3.88 (1H, dd, J = 10.1, 9.5 Hz, H-3''), 3.80 (1H, dd, J = 10.1, 10.1 Hz H-6''), 3.75 (1H, dd, J = 9.5, 9.5 Hz, H-4''), 3.55-3.30 (5H, m), 3.30 (1H, dd, J = 10.3, 3.8 Hz, H-2), 2.22 (1H, m, Hz), 2.21 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-OH), 1.41 (1H, m, Hz), 1.06 (9H, s, t-Bu-Si), 0.94 (9H, s, t-Bu-Si).

¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ : 138.1 (C, Bn), 137.7 (C, Bn), 128.9 (2xCH, Bn), 128.5 (2xCH Bn), 128.2 (CH, Bn), 127.94 (CH Bn), 127.92 (2xCH, Bn), 127.6 (2xCH, Bn), 96.9 (CH, C-1''), 83.2 (CH, C-5), 79.3 (CH, C-6), 77.0 (CH, C-2''), 76.9 (CH, C-4''), 76.4 (CH, C-4), 75.3 (CH₂, Bn), 73.4 (CH₂, Bn), 67.1 (CH, C-5''), 66.6 (CH₂, C-6''), 64.8 (CH, C-3''), 60.4 (CH, C-3), 59.7 (CH, C-1), 31.9 (CH₂, C-2), 27.6 (3 x CH₃, Si), 26.9 (3 x CH₃, Si), 22.7 (C, Si), 19.8 (C, Si).

MS-API-ES: 744.3 (M+Na)⁺.

4.4.1.12.- 6-O-(3-desoxi- α -D-3-amino-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina, **83**



Sobre una disolución del compuesto **98** (0.17 g, 0.23 mmol) en THF anhidro (5 mL) se añadió TBAF (1.15 mL, 1.15 mmol). La disolución resultante se agitó durante 24 h a t.a. bajo Ar, tras las

cuales se concentró la disolución hasta aproximadamente 20 mL, observándose la formación de un sólido blanco, que, tras ser filtrado se lavó con Et₂O frío, obteniéndose el hidrocloreto de neamina (2.3 g, 89%).

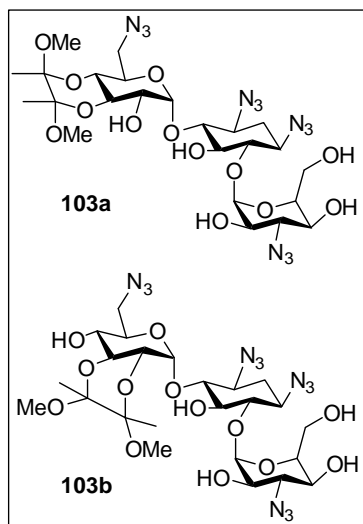
¹H RMN (D₂O, 400 MHz) δ: 5.90 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 4.03-3.92 (m, 3H), 3.68 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.59-3.24 (m, 7H), 2.49 (dt, *J* = 12.6, 4.3 Hz, 1H), 1.89 (q, *J* = 12.6 Hz, 1H).

¹³C RMN (D₂O, 100 MHz) δ: 98.1, 79.7, 77.2, 74.5, 72.7, 71.2, 70.3, 55.5, 51.7, 50.5, 42.1, 30.3.

MS-API-ES (Neamina·4HCl): 323 (M+H)⁺

4.4.2. Síntesis de 4-O-(3-desoxi-3-amino-2,4-α-D-xilopiranosil)- 6-O-(3-desoxi-3-amino-α-D- glucopiranosil) 2-desoxiestreptamina (84).

4.4.2.1.- 3'-4'- O,O- (2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-1,3,6',3''- tetra-azido-kanamicina A y 2'-3'- O,O- (2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-1,3,6',3''- tetra-azido-kanamicina A, **103a** y **103b**



Sobre una disolución de la mezcla de compuestos **94a** y **94b** (0.700 g, mmol) en THF anhidro (20 mL), se añadió TBAF (5 mL 4.98 mmol) la solución resultante se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente, bajo argón. Después de este tiempo se controló la reacción por TLC (hexano/AcOEt. 4:6) posteriormente concentrar la reacción a presión reducida el crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 3:7).

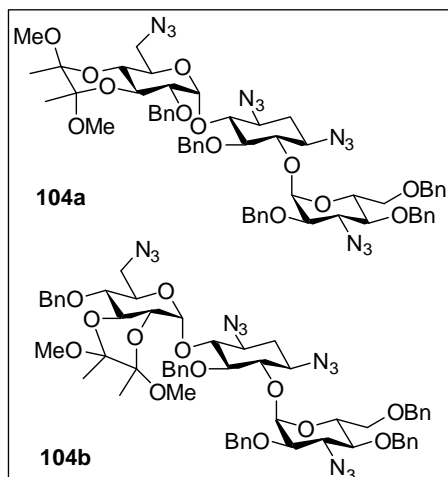
103a + 103b: ¹H RMN (MeOD-*d*₄, 400 MHz) δ: 5.35 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, -anom.), 5.30 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, -anom.), 5.20 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, -anom.), 5.16 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, -anom.), 4.14 (dd, *J* = 4.8, 2.8 Hz, 1H), 4.10 (ddd, *J* = 11.4, 4.3, 2.4 Hz, 1H), 4.02 (ddd, *J* = 9.7, 5.0, 2.4 Hz, 1H), 3.96 (dd, *J* = 10.4, 9.4 Hz, 1H), 3.88 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H), 3.75-3.71 (m, 4H), 3.70 (dd, *J* = 3.8, 3.2 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 5.2, 2.7 Hz, 1H), 3.62 (dd, *J* =

6.6, 2.7 Hz, 1H), 3.60-3.57 (m, 6H), 3.56 (dd, $J = 6.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.54-3.51 (m, 4H), 3.49 (dd, $J = 9.2, 4.6$ Hz, 1H), 3.42-3.35 (m, 9H), 3.33 (dd, $J = 2.7, 1.9$ Hz, 1H), 3.26 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.23 (s, 3H), 2.39-2.31 (m, 2H), 1.52 (q, $J = 14.8$ Hz, 1H), 1.50 (q, $J = 12.5$ Hz, 1H), 1.27 (s, 6H), 1.26 (s, 3H), 1.24 (s, 3H).

103a + 103b: ^{13}C RMN (MeOD- d_4 100 MHz) δ : 101.2, 100.2, 99.8, 99.7, 99.6, 98.9, 98.8, 98.6, 83.7, 83.6, 80.8, 80.5, 74.5, 74.4, 73.1, 72.1, 71.2, 71.1, 70.0, 69.8, 69.6, 69.1, 69.0, 68.5, 68.4, 67.9, 67.4, 67.2, 61.1, 61.0, 60.9, 60.7, 60.6 (2C), 59.7, 59.4, 51.2, 50.3, 32.4, 32.2, 29.4 (2C), 26.7 (2C), 16.8, 16.7, 16.6, 16.5.

MS-API-ES: 725.3 (M+Na) $^+$.

4.4.2.2.- 5,4',2'',4'',6''-O-penta-bencil-3',4'-O,O-(2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-1,3,6',3''- tetra-azido-kanamicina **A** y 5,4',2'',4'',6''-O-penta-bencil-2',4'-O,O-(2,3-butanodiona-bis-dimetil-acetal)-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina **A**, **104a** y **104b**



Sobre una disolución de la mezcla de compuestos **103a** y **103b** (0.80 mg, 0.76 mmol) y TBAI (0.10 g, 0.28 mmol) en DMF anhidra (3.8 mL) a 0 °C se adicionó NaH al 60% (5.7 mmol, 7.5 eq.). La mezcla obtenida se agitó durante 10 min. bajo argón a esa temperatura. Posteriormente se adicionó gota a gota BnBr (0.54 mL, 4.56 mmol) y la mezcla se agitó a t.a. durante 24 h. Pasado este tiempo, se paró la reacción con la adición de MeOH

(3 mL) y se llevó a sequedad. Sobre el crudo de la reacción se añadió una disolución ac. sat. de NaCl y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 25 mL), se secó con NaSO_4 anhidro y se filtró. Finalmente, se eliminó el disolvente a sequedad coevaporando con tolueno. El crudo se purificó por cromatografía en columna usando como eluyente (hexano/AcOEt, 95:5), obteniendo la mezcla de compuestos **104a** y **104b** (0.56 g, 65%) como un sólido blanco.

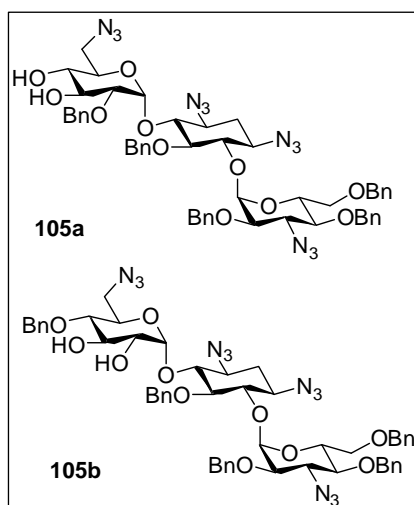
104a + 104b: ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.46-6.86 (m, 50H, Ar), 5.55 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, -anom.), 5.54 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, -anom.), 5.53 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H, -anom.), 5.39 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, -anom.), 5.32 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 5.10 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H), 4.96 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.81 (sistema AB, 2H), 4.68 (m, 4H), 4.61 (d, $J = 11.7$ Hz,

1H), 4.52 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.52 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.43 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.38 (ddd, $J = 10.0, 4.4, 2.4$ Hz, 1H), 4.29 (dt, $J = 9.5, 3.2$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.11 (m, 3H), 4.15-4.07 (m, 2H), 3.72-3.69 (m, 2H), 3.67 (dd, $J = 8.9, 5.1$ Hz, 1H), 3.66-3.65 (m, 7H), 3.64 (dd, $J = 9.8, 3.7$ Hz, 1H), 3.59-3.56 (m, 5H), 3.51-3.48 (m, 5H), 3.48 (s, 3H), 3.44 (dd, $J = 8.5, 4.6$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 3.7, 2.6$ Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 3.6, 2.7$ Hz, 1H), 3.30 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 3.28 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.26 (s, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 3.11 (dd, $J = 11.1, 1.8$ Hz, 1H), 3.06 (dd, $J = 11.1, 1.8$ Hz, 1H), 2.79 (dd, $J = 10.9, 2.4$ Hz, 1H), 2.77 (dd, $J = 10.9, 2.4$ Hz, 1H), 2.40 (dt, $J = 12.9, 4.0$ Hz, 2H), 1.66 (q, $J = 12.9$ Hz, 2H), 1.28 (s, 3H), 1.26 (s, 3H), 1.22 (s, 3H), 0.98 (s, 3H).

104a + 104b: ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3) δ : 138.6, 138.5, 138.2 (2C), 138.1, 137.9, 137.8 (2C), 137.6, 137.5, 128.7 (4C), 128.6 (3C), 128.5 (4C), 128.4 (5C), 128.3 (4C), 128.2 (5C), 128.2 (5C), 128.1 (2C), 128.0 (3C), 127.9 (3C), 127.8 (2C), 127.7, 127.6 (2C), 127.0, 126.8 (2C), 126.1 (2C), 125.3 (2C), 99.8, 99.7, 99.6, 99.4, 98.5, 97.9, 96.3, 96.2, 82.5, 82.2, 78.5, 78.1, 77.7, 77.6, 77.5, 76.3, 76.1, 76.0, 75.4, 75.1, 75.0, 74.8, 74.7, 74.5 (2C), 73.6 (2C), 73.2, 73.1, 71.2, 70.3 (2C), 70.1 (2C), 69.8, 69.4, 67.7, 67.6, 67.5, 66.8, 65.6, 65.5, 60.6, 60.5, 58.9, 58.6, 51.6, 50.8, 50.7, 48.3, 48.2, 48.1, 31.8 (2C), 18.1, 18.0, 17.9, 17.4.

MS-API-ES: 1175.6 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

4.4.2.3.- 5,2',2'',4'',6''-O-penta-bencil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A y 5,4',2'',4'',6''-O-penta-bencil-1,3,6',3''-tetra-azido-kanamicina A, **105a** y **105b**



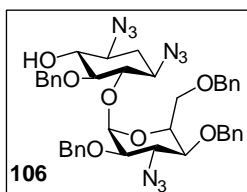
Sobre una disolución del compuesto **104a** y **104b** (0.50 g, 0.44 mmol) en CH_2Cl_2 (4.6 mL) se añadió TFA y H_2O (2 mL, 10:1 v/v). La mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 40 min. Transcurrido este tiempo se añadió cuidadosamente una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrajo con AcOEt (2 x 50 mL). La fase orgánica se separó, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo obtenido fue purificado mediante una cromatografía en columna en gel de sílice

empleando como eluyente (hexano/AcOEt 7:3), obteniendo los derivados **105a** (0.15 g, 65%) como un sólido blanco y **105b** (0.15 g, 65%) como una espuma blanca.

105a: ^1H RMN (MeOD- d_4 , 400 MHz) δ : 7.43 – 6.92 (m, 25H), 5.57 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 5.42 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.86 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.74 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 4.64 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H), 4.30 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 4.20 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.16 (ddd, $J = 9.9, 5.4, 2.5$ Hz, 1H), 4.15 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 3.80 (ddd, $J = 10.2, 3.7, 1.9$ Hz, 1H), 3.78- 3.74 (m, 2H), 3.68 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H), 3.63-3.46 (m, 4H), 3.39 (dd, $J = 13.2, 2.4$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 10.4, 3.6$ Hz, 1H), 3.30-3.22 (m, 2H), 3.21-3.15 (m, 2H), 3.05 (dd, $J = 11.1, 3.7$ Hz, 1H), 2.29 (dt, $J = 13.0, 4.2$ Hz, 1H), 1.50 (q, $J = 12.2$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (MeOD- d_4 , 100 MHz) δ : 138.5, 138.0, 137.9, 137.8, 137.7, 128.0 (2C), 128.1 (2C), 127.9 (2C), 127.8 (3C), 127.7 (6C), 127.6 (3C), 127.5, 127.3, 127.2, 127.1, 126.6, 126.5 (2C), 97.9, 95.3, 82.8, 78.5, 78.1, 77.9, 77.3, 76.2, 74.3, 73.8, 72.9, 72.6, 72.0, 70.7, 70.0, 67.9, 65.5, 60.2, 59.5, 51.2, 48.2, 30.9. MS-API-ES: 1039 (M+1) $^+$.

105b: ^1H RMN (MeOD- d_4 400 MHz) δ : 7.38- 6.91 (m, 25H), 5.50 (s, 1H), 5.49 (s, 1H), 4.90 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.60 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 4.45 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.28 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 4.17 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 4.15 (ddd, $J = 11.0, 5.9, 3.1$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 11.4, 6.8$ Hz, 1H), 3.79 (dd, $J = 9.6, 9.2$ Hz, 1H), 3.70 (ddt, $J = 8.8, 4.1, 2.1$ Hz, 1H), 3.61- 3.53 (m, 2H), 3.53-3.44 (m, 2H), 3.35 (dd, $J = 13.2, 5.6$ Hz, 1H), 3.27 (dd, $J = 10.4, 3.7$ Hz, 1H), 3.22- 3.18 (m, 2H), 3.14 (dd, $J = 6.8, 3.0$ Hz, 1H), 3.12 (dd, $J = 6.9, 3.0$ Hz, 1H), 3.07 (dd, $J = 11.2, 1.9$ Hz, 1H), 2.90 (dd, $J = 11.1, 3.4$ Hz, 1H), 2.31 (dt, $J = 12.9, 4.5$ Hz, 1H), 1.52 (q, $J = 12.2$ Hz, 1H). ^{13}C RMN (MeOD- d_4 , 100 MHz) δ : 138.1, 137.9, 137.8, 137.7, 137.6, 128.1 (2C), 128.0 (2C), 127.9 (2C), 127.8 (4C), 127.7 (2C), 127.6 (4C), 127.5, 127.4 (2C), 127.3, 127.2, 127.1, 126.6, 125.8 (2C), 96.6, 95.4, 82.5, 79.0, 77.9, 77.7, 76.8, 76.1, 74.1, 73.4, 72.9 (2C), 72.6, 71.7, 71.1, 69.8, 67.7, 65.4, 60.2, 59.4, 51.3, 48.2, 31.5. MS-API-ES: 1039 (M+1) $^+$.

4.4.2.4- *1,3-Diazido-5-O-bencil-6-O-(3-desoxi-3-azido-2,4,6-O-tri-bencil- α -D-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina*, **106**



Sobre una disolución del compuesto **105b** (0.15 g, 0.16 mmol) en MeOH (2.6 mL) a 0 °C se añadió NaIO₄ (0.07 g, 0.31 mmol). La suspensión resultante se agitó a t.a. durante una noche. Tras observarse la desaparición del producto de partida por TLC (hexano/AcOEt 6:4), la mezcla se diluyó con AcOEt (10 mL) y la mezcla se filtró sobre Celite®. La fase orgánica se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y con una disolución acuosa saturada de NaCl y se secó sobre Na₂SO₄, eliminando finalmente el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en MeOH (7 mL) y sobre la disolución se añadió TEA (43 µL, 0.31 mmol). La reacción se agitó durante una noche a t.a., tras la cual se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purificó en columna cromatográfica de gel de sílice (hexano/AcOEt, 6:2), obteniendo **106** (0.11 g, 88%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz) δ: 7.43-7.09 (m, 20H, Ar), 5.62 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, -anom.), 4.84- 4.71 (m, 5H) 4.51 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.07-4.05 (m, 1H), 3.90 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H) 3.60-3.53 (m, 2H), 3.47-3.30 (m, 7H), 2.48 (br s, 1H), 2.30-2.25 (m, 1H), 1.53-1.45 (m, 1H).

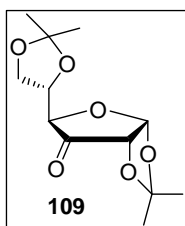
¹³C RMN (CDCl₃, 125 MHz) δ: 137.87, 137.66, 137.39, 137.28, 128.49, 128.32, 128.24, 128.18, 128.09, 127.97, 127.75, 127.70, 95.61, 82.45, 77.34, 76.91, 76.86, 76.32, 76.14, 74.80, 73.41, 72.93, 69.88, 67.74, 65.48, 60.72, 59.84, 31.76.

ESI-MS: 784.4 (M+Na)⁺.

4.4.2.5.- 2,4-*O*-di-bencil-3-desoxi-3-azida-1-tiofenil- α -D-xilopiranososa y 2,4-*O*-di-bencil-3-desoxi-3-azida-1-tiofenil- β -D-xilopiranososa, **107a** y **107b**

Procedimiento 1

4.4.2.5.1a.-1,2-5,6-Di-*O*-isopropiliden-3-ceto- α -D-glucofuranosa , **109**



Sobre una disolución de anhídrido acético (2.2 mL, 23.2 mmol) en CH₂Cl₂ seco (21 mL) se añadió PDC (2.7 g, 7.4 mmol) y una disolución del derivado **108** (1.9 g, 7.3 mmol) en la mínima cantidad posible de CH₂Cl₂ seco. La mezcla se mantuvo a 75 °C durante 4 h. tras cuales se diluyó con AcOEt (30 mL) y se filtró el precipitado formado. Tras

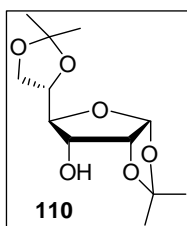
eliminar el disolvente del filtrado a presión reducida se adicionó Et₂O (20 mL) y el filtrado formado se eliminó de nuevo por filtración. El filtrado se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se llevó a sequedad, obteniendo un aceite amarillo cuya purificación en columna de cromatografía en gel de sílice (hexano:AcOEt, 4:1) permitió la obtención de **109** (1.72 g, 91%) como un aceite incoloro.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 6.14 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 4.39 (d, *J* = 4.5 Hz, 1 H), 4.35-4.38 (m, 2 H), 4.01-4.03 (m, 2 H), 1.46 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.34 (s, 6H).

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 208.8, 114.3, 110.4, 103.1, 79.0, 77.3, 76.4, 64.3, 27.6, 27.2, 26.0, 25.3.

ESI-MS: 259 (M+H)⁺.

4.4.2.5.2a.- 1,2-5,6-Di-O-isopropiliden-α-D-alofuranosa , **110**



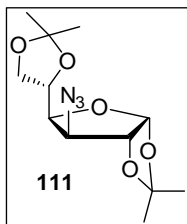
Sobre una disolución del compuesto **109** (1.6 g, 6.2 mmol) en EtOH (9 mL) y H₂O (1mL) a 0 °C se añadió NaBH₄ (0.6 g, 16 mmol) y la mezcla resultante se agitó a esa temperatura durante 1h. Posteriormente se adicionó una disolución acuosa de NH₄Cl hasta que dejó de observarse la formación de burbujas. La mezcla resultante se concentró a presión reducida y el sólido obtenido se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). El combinado de fases orgánicas se lavó con H₂O (2 x 10 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. La cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/ AcOEt, 2: 1 dio lugar al derivado **110** (1.45 g, 90%) como un sólido blanco.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ: 5.82 (d, *J* = 4 Hz, 1 H), 4.61 (dd, *J* = 5, 4 Hz, 1 H), 4.3 (m, 1 H), 4.00-4.10 (m, 3 H), 3.82 (dd, *J* = 6.5, 5Hz, 1 H), 2.56 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 1.58 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.39 (s, 3H), 1.37 (s, 3H).

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ: 112.9, 109.9, 104.0, 79.9, 79.0, 75.7, 72.6, 66.0, 26.6, 26.5, 26.3, 25.3.

ESI-MS: 261 (M+H)⁺.

4.4.2.5.3a.- 1,2-5,6-Di-O-isopropiliden-3-azido-3-desoxi- α -D-glucofuranosa, **111**



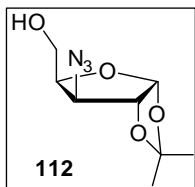
Sobre una disolución del compuesto **110** (1.4 g, 5.4 mmol) y piridina (0.88 mL, 10.9 mmol) en CH₂Cl₂ seco (16 mL) a -30 °C bajo atmósfera de Ar se añadió gota a gota Tf₂O (1.1 mL, 6.4 mmol) durante un tiempo aproximado de 15 min. La suspensión resultante se agitó a esa misma temperatura durante 30 min. más tras los cuales se adicionó MeOH (0.65 mL) y la disolución resultante se llevó hasta t.a. Ésta se lavo con H₂O (2 x 50 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida, obteniendo un aceite de color amarillo que fue disuelto en DMF seca (11 mL). Sobre la disolución se añadió NaN₃ (1.4 g, 21.5 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 50 °C durante una noche. Tras enfriar la reacción, sobre la disolución se añadió CHCl₃ (10 mL) y H₂O (10 mL) y se separaron las fases. La orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró obteniendo un aceite amarillo. La purificación en cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/AcOEt, 5:1) dio lugar al compuesto **111** (1.4 g, 92%, 2 etapas) como un aceite incoloro.

¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ : 5.84 (d, J = 3.5 Hz, 1 H), 4.60 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 4.23 (m, 1 H), 4.12 (dd, J = 8.5, 6 Hz, 1 H), 4.08 (m, 2 H), 3.96 (dd, J = 8.5, 5 Hz, 1 H), 1.50(s, 3H), 1.42 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.31 (s, 3H).

¹³C RMN (CDCl₃, 75 MHz) δ : 112.3, 109.6, 105.1, 83.5, 80.6, 73.1, 67.7, 66.4, 26.9, 26.7, 26.2, 25.2.

ESI-MS: 308 (M+Na)⁺.

4.4.2.5.4a.- 3-Azido-3-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-ribofuranosa, **112**



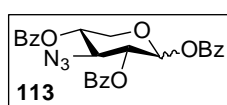
Una mezcla del compuesto **111** (1.32 g, 4.6 mmol) en una disolución acuosa de AcOH al 75% (15 mL) se mantuvo en agitación a 55 °C durante 1.5 h., tras las cuales la mezcla de reacción se concentró coevaporando con tolueno. El residuo así obtenido se disolvió en EtOH (15 mL) y se trató con una disolución de NaIO₄ (1.18 g, 5.5 mmol) en H₂O (7.5 mL) manteniendo la reacción a 0 °C. Posteriormente la mezcla se agitó durante 20 min. tras los cuales se adicionó NaBH₄ (0.5 g, 13.8 mmol) y se agitó a 0 °C durante 1h. adicional. Finalmente, la reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. La

cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/AcOEt, 1:1) dio lugar al compuesto **112** (0.84 g, 85%) como un aceite incoloro.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 5.79 (d, $J = 3.4$ Hz, 1 H), 4.72 (t, $J = 4.1$ Hz, 1 H), 4.09 (m, 1 H), 3.96 (dd, $J = 12.5, 2.4$ Hz, 1 H), 3.66 (dd, $J = 12.6, 2.9$ Hz, 1H), 3.56 (dd, $J = 9.5, 4.6$ Hz, 1 H), 1.56 (s, 3H), 1.35 (s, 3 H).

ESI-MS: 216 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

4.4.2.5.5a.- 3-Azido-1,2,4-tri-O-benzoil-3-desoxi-D-xilopiranos, **113**



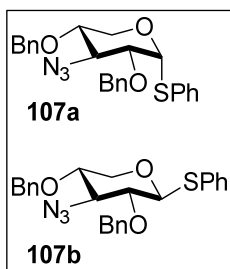
Una disolución del compuesto **112** (0.71 g, 3.33 mmol) en una mezcla de $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (166 mL, 1:1 v/v) se mantuvo a reflujo durante 3 horas. La disolución resultante se concentró y el residuo obtenido se purificó en columna de cromatografía en gel de sílice (hexano/AcOEt, 4:1) para dar una mezcla de trioles en forma de piranosa y furanosa (α y β) que fueron utilizados sin purificación previa. Dicha mezcla en CH_2Cl_2 seco (7.5 mL) a 0 °C fue tratada con TEA (2.4 mL, 17.3 mmol), DMAP (21 mg, 1.7 mmol) y con una disolución de BzCl (2 mL, 17.3 mmol) en CH_2Cl_2 seco (7.5 mL). La disolución resultante se agitó a t.a. durante 1h. tras la cual fue diluida con AcOEt (140 mL) y lavada con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 140 mL), con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 140 mL). Finalmente la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. La purificación del crudo así obtenido en columna en cromatografía en gel de sílice permitió la obtención del derivado **113** (0.23 g, 15%, 2 etapas), mayoritariamente en su forma piranosa.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.23-8.15 (m, 6H), 8.09- 8.01 (m, 1H), 8.00- 7.97 (m, 1H), 7.69-7.59 (m, 4H), 7.57-7.39 (m, 9H), 7.29-7.24 (m, 1H), 6.48 (d, $J = 5.10$ Hz, 1H), 5.68-5.55 (m, 2H), 4.49 (t, $J = 3.49$ Hz, 1H), 4.22 (m, 2H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 166.6, 58.4, 58.5, 59.9, 166.2, 165.9, 165.7, 165.5, 165.4, 165.0, 164.8 4 (3C), 134.4, 134.2, 134.2, 134.1, 130.6, 130.6, 130.5, 130.4, 129.2, 129.1 (2), 129.0 (3), 128.9, 128.8, 99.3, 95.1, 91.6, 89.1, 69.3, 68.6, 68.3, 66.6, 63.2.

ESI-MS: 488 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

4.4.2.5.6a.- 1-tiofenil-3-Azido-2,4-di-O-bencil-3-desoxi- α -D-xilopiranososa y 1-tiofenil-3-Azido-2,4-di-O-bencil-3-desoxi- β -D-xilopiranososa, **107a** y **107b**



Sobre una disolución del derivado 113 (0.23 g, 0.47 mmol) en CH_2Cl_2 seco (1.25 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de Ar se adicionó PhSH (57 μL , 0.56 mmol) y $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (86 μL , 0.70 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. durante una noche tras la cual se neutralizó cuidadosamente con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (20 mL) y se extrajo con AcOEt (2 x 20 mL). El combinado de fases orgánicas se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo se filtró sobre gel de sílice (hexano/AcOEt, 3:1), obteniéndose un aceite incoloro que se disolvió en MeOH (5 mL). La mezcla así obtenida fue tratada con una disolución 2M de NaOMe preparada in situ hasta pH = 12 y se mantuvo en agitación durante 4h. Posteriormente la disolución fue neutralizada con Amberlita® IRA-120 (H^+) hasta pH = 6, se filtró y se concentró a presión reducida, obteniéndose un diol que fue utilizado sin purificación previa en la siguiente reacción. En ella una disolución del mismo en DMF seca (3 mL) a 0 °C bajo atmósfera de Ar fue tratada con NaH (0.10 g, 2.6 mmol), TBAI (51 mg, 0.14 mmol) y con BnBr (0.25 mL, 2.1 mmol) y la mezcla se mantuvo en agitación durante 1 noche. Pasado este tiempo la reacción se detuvo mediante la adición de MeOH (1 mL) y la agitación de la mezcla durante 20 min. Tras la eliminación del disolvente a presión reducida, el crudo obtenido se disolvió en CH_2Cl_2 (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación en cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/AcOEt, 9:1) del residuo obtenido dio lugar a la mezcla de compuestos **107a** y **107b** (0.10 g, 48%) en una proporción 80:20 como un sólido blanco.

107a: ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.45-7.27 (m, 15H), 5.50 (d, J = 5.3 Hz 1H), 4.78- 4.59 (m, 4H), 4.04 (t, J = 11 Hz 1H), 3.78 (t, J = 9.8 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 11, 9.98 Hz, 1), 3.61 (dd, J = 9.8, 5.3 Hz, 1H), 3.37(ddd, J = 11, 9.8, 5.3 Hz, 1H).

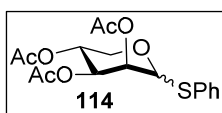
107b: ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.45-7.27 (m, 15H), 4.90-4.58 (m, 5H), 4.22 (t, J = 6Hz, 1H).59 (m, 4H), 3.72-3.65 (m, 2H), 3.50-3.41(m, 1H, 2H).

107a + 107b: ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 137.6, 137.04, 133.8, 131.8, 128.9, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1 (3C), 128.0, 127.9, 127.3, 86.6, 77.5, 75.9, 73.4, 72.4, 65.2, 60.5.

MS-API-ES: 470 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Procedimiento 2

4.4.2.5.1b.- 1-Tiofenil-2,3,4-tri-acetil-D-arabinopiranos, 114



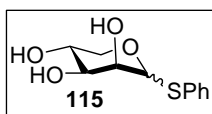
Una disolución de D-arabinosa comercial (3.3 g, 21.98 mmol) y DMAP (0.80 g, 6.6 mmol) en una mezcla de py/ Ac_2O (12 mL, 3:1 v/v) se agitó a t.a. durante 24 hr. Tras comprobar la desaparición del producto de partida por TLC (hexano/ AcOEt , 2:1) la mezcla de reacción se neutralizó con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase acuosa, una vez separada, se extrajo con AcOEt (2 x 10 mL) y seguidamente el combinado de fases orgánicas se lavó secuencialmente con una disolución acuosa 1M de HCl (2 x 10 mL) y con otra disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 10 mL). Finalmente la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El producto así obtenido se empleó sin purificación previa en la siguiente etapa. Para ello se disolvió en CH_2Cl_2 seco (2.5 mL) y la disolución resultante a 0 °C se trató con PhSH (3.4 mL, 32.9 mmol) y con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (4 mL, 32.9 mmol). Después de agitar durante una noche a t.a. la mezcla de reacción se neutralizó con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (100 mL) y se extrajo con AcOEt (2 x 100 mL). El combinado de fases orgánicas se lavó con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 100 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/ EtOAc , 2:1) obteniendo **114** (6.47 g, 80% en dos etapas) como un aceite incoloro

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.49-7.46 (m, 2 H) 7.28-7.27 (m, 3 H), 5.26-5.20 (m, 1H), 5.23 (t, $J = 8.2$, 1H), 5.09 (dd, $J = 8.4$, 3.4, 1H), 4.80 (d, $J = 7.8$, 1H), 4.12 (dd, $J = 12.7$, 4.2, 1H), 3.65 (dd, $J = 12.7$, 2.0, 1H), 2.06 (s, 6H, 2COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 169.9, 169.7, 169.2, 133.1, 132.1, 128.8, 127.7, 86.5, 70.3, 68.3, 67.4, 65.1, 20.63, 20.61, 20.5.

MS-API-ES: 391 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

4.4.2.5.2b.- 1-Tiofenil-D-arabinopiranosas, **115**



Sobre una suspensión de **114** (3.8 g, 10 mmol) en MeOH (100 mL) se añadió CH_2Cl_2 hasta la total disolución del producto de partida.

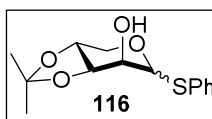
Posteriormente se adicionó K_2CO_3 (0.38 g, 5.2 mmol) y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 h. a t.a. Finalmente la mezcla se concentró a presión reducida y el crudo se purificó a través de una columna de cromatografía en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1) obteniéndose **115** (2.6 g, 90%) como un aceite incoloro.

^1H MNR ($\text{MeOD}-d_4$, 400 MHz) δ : 7.57 (m, 2H), 7.40 (m, 3H), 4.72 (d, $J = 8.3$ Hz 1H), 4.00 (s, 1H), 3.93 (dd, $J = 12.8$, 2.33 Hz, 1H), 3.67 (m, 3H).

^{13}C MNR ($\text{MeOD}-d_4$, 100 MHz) δ : 135.0, 134.4, 132.2, 130.8, 91.2, 76.1, 72.5, 72.0, 71.2.

MS-API-ES: 265.05 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$

4.4.2.5.3b.- 1-Tiofenil-3,4-O,O-isopropiliden-D-arabinopiranosas, **116**



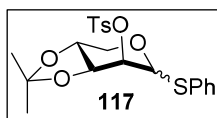
Sobre una disolución de **115** (2.0 g, 8.3 mmol) en CH_2Cl_2 seco (60 mL) se añadió 2,2-dimetoxi-propano (1.2 mL, 9.9 mmol) y p-TosOH (0.42 g, 2.5 mmol). Después se dejó agitando a t.a. durante 24 h. tras

las cuales la mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Finalmente se purificó el crudo mediante una cromatografía en columna en gel de sílice (hexano/AcOEt, 1:1) obteniéndose **116** (1.4 g, 60%) como un aceite incoloro.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.71-7.67 (m, 2H), 7.27-7.09 (m, 3H), 4.79 (s, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.99 (dd, $J = 11.4$, 7.9 Hz 1H), 3.80-3.73 (m, 2H), 3.41 (dd, $J = 11.4$, 3.5 Hz, 1H), 2.26 (s, 6H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ : 132.6, 132.2, 129.0, 128.0, 88.1, 78.1, 72.9, 71.4, 65.7, 27.9, 26.1.

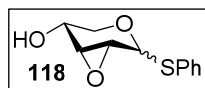
MS-API-ES: 305 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

4.4.2.5.4b.- 1-Tiofenil-2-tosil-3,4-O,O-isopropiliden-D-arabinopiranos, **117**

Sobre una disolución de **116** (1.2 g, 4.3 mmol) en piridina (60 mL) previamente enfriada a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, se adicionó una disolución de TsCl monohidrato (1.06 g, 5.5 mmol) en piridina (24 mL). Después de agitar durante 5h. a esa temperatura la mezcla de reacción se llevó hasta t.a. manteniendo la agitación durante 18 h más. Transcurrido este tiempo la reacción se detuvo adicionando MeOH (18 mL) y se concentró a presión reducida. El crudo se disolvió en CH_2Cl_2 (150 mL) y se lavó secuencialmente con una disolución acuosa 1M de HCl (3 x 150 mL) y una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 150 mL). Las fases acuosas fueron nuevamente extraídas con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL) y el combinado de fases orgánicas se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a vacío. El crudo de reacción se purificó en columna de cromatografía en gel de sílice (hexano/AcOEt, 9:1), obteniendo **117** (1.3 g, 90%) como un aceite incoloro.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.68 (m, 2H), 7.27-7.07 (m, 7H), 4.75 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.95 (dd, $J = 11.4, 7.9$ Hz 1H), 3.74-3.68 (m, 2H), 3.35 (dd, $J = 11.4, 3.5$ Hz, 1H), 2.25 (s, 6H).

MS-API-ES: 336.7 ($\text{M} + \text{H}$) $^{+}$.

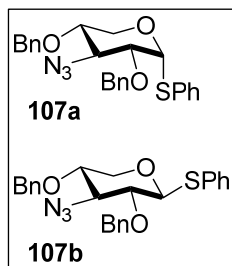
4.4.2.5.5b.- 1-Tiofenil-2, 3-anhidro-D-ribopiranos, **118**

Sobre una disolución de **117** (1.2 g, 2.7 mmol) en MeOH (20 mL) se adicionó una disolución acuosa 1N de HCl (4 mL) y la mezcla resultante se agitó a t.a. durante 3h. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente a presión reducida coevaporando con tolueno y el crudo resultante se disolvió en DMF seca (15 mL). Posteriormente se añadió NaH (0.12 g, 2.9 mmol) y se mantuvo en agitación a t.a. durante 1 h, tras la cual se vertió sobre una mezcla de hielo y H_2O y la fase acuosa se extrajo con Et_2O (50 mL) y con tolueno (50 mL). El combinado de fases orgánicas se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida dando lugar a **118** (0.30 g, 50%, 2 etapas).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7.50-7.44 (m, 2H), 7.32-7.22 (m, 3H), 5.58 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.11- 4.05 (m, 1H), 3.37-3.28 (m, 2H), 2.98 (s, 1H), 2.85 (s, 1H).

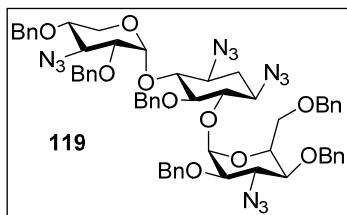
MS-API-ES: 247 (M+Na)⁺.

4.4.2.5.6b.- 1-tiofenil-3-Azido-2,4-di-O-bencil-3-desoxi- α -D-xilopiranososa y 1-tiofenil-3-Azido-2,4-di-O-bencil-3-desoxi- β -D-xilopiranososa **107a** y **107b**



Sobre una disolución de **118** (0.30 g, 1.44 mmol) en DMF seca (2 mL) se adicionó NaN₃ (0.10 g, 1.54 mmol) y la mezcla se mantuvo en agitación a 90 °C durante una noche. Tras enfriarla hasta t.a. el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en AcOEt (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL) y con otra disolución acuosa saturada de NaCl (10 mL). Las fases acuosas se volvieron a lavar con AcOEt (2 x 10 mL) y el combinado de fases orgánicas se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y finalmente se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose el diol correspondiente que fue empleado en la reacción de bencilación posterior sin purificación previa, tal como se describe en el apartado 4.4.1.17.6. de esta Memoria, obteniéndose una mezcla de **107a** y **107b** (0.27 g 42% en dos etapas) en una proporción 70:30. Las propiedades espectroscópicas de los compuestos preparados fueron idénticas a las descritas en el apartado 4.4.1.17.6. de esta Memoria para estos mismos compuestos.

4.4.2.6.- 1,3-Diazido-4-O-(3-desoxi-3-azido-2,4-di-bencil- α -D-xilopiranosil)-5-O-bencil-6-O-(3-desoxi-3-azido-2,4,6-O-tri-bencil- α -D-glucopiranosil)-2-desoxiestreptamina, **119**



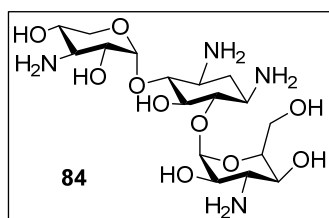
Sobre una disolución del compuesto **106** (0.1 g, 0.13 mmol) y **107** (71 mg, 0.16 mmol) en una mezcla Et₂O/CH₂Cl₂ (6 mL, 3:1 v/v) a -40 °C se adicionó NIS (36 mg, 0.16 mmol) y TfOH (4 μ L, 0.048 mmol). La disolución se dejó agitando bajo Ar a esta temperatura durante 2 h. tras las cuales la reacción se neutralizó con TEA (0.5 mL). La disolución resultante se concentró a presión reducida y el crudo obtenido se purificó en columna de cromatografía en gel de sílice (hexano/AcOEt 9:1→8:2) obteniéndose **119** (85 mg, 60%) como un sólido blanco.

^1H RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ : 7.42- 6.82 (m, 30H), 5.49 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 5.40 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 4.90 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.74 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.63 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.62 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H), 4.46 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 4.35 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J = 12.1$ Hz, 1H), 4.10 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.06 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 3.91 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 3.80 (t, $J = 11.0$ Hz, 1H), 3.62 (dd, $J = 9.6, 1.4$ Hz, 1H), 3.60-3.56 (m, 3H), 3.56 -3.51 (m, 1H), 3.51-3.37 (m, 3H), 3.30 - 3.23 (m, 2H), 3.20 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.04 (dt, $J = 10.4, 2.9$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 11.0, 2.6$ Hz, 1H), 2.32 (dt, $J = 13.0, 4.4$ Hz, 1H), 1.55 (q, $J = 13.0$ Hz, 1H).

^{13}C RMN (CDCl_3 , 125 MHz) δ : 136.7, 136.5, 136.4, 136.3, 136.0, 127.5 (2C), 127.4 (2C), 127.3 (2C), 127.2 (5C), 127.1 (5C), 127.0 (3C), 126.9 (2C), 126.8 (2C), 126.7 (2C), 126.6 (2C), 126.5 (2C), 126.4, 126.0, 95.0, 94.9, 81.6, 76.7, 76.1 (2C), 75.3, 74.8, 73.4, 73.2, 72.7, 72.4, 72.0, 71.9, 68.8, 66.5, 64.3, 63.6, 59.4, 59.2 (2C), 58.2, 31.9.

MS-API-ES: 1099 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

4.4.2.7.- 4-*O*-(3-desoxi-3-amino- α -D-xilopiranosil)- 6-*O*-(3-desoxi-3-amino- α -D-glucopiranosil) 2-desoxiestreptamina, **84**



Sobre una disolución del compuesto **119** (85 mg, 0.078 mmol) en THF (2.5 mL), bajo atmosfera de Ar y a t.a., se añadió secuencialmente una disolución acuosa 0.1 M de NaOH (0.15 mL) y una disolución 1M de PMe_3 en THF (0.42 mL). La disolución resultante se agitó durante 24 h a

58 °C tras las cuales se añadió MeOH (1 mL) y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se filtró sobre gel de sílice ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{ButOH}/\text{EtOH}/\text{Tolueno}$, 4:3.5:2:1), obteniendo un aceite incoloro que fue empleado sin más purificación en la hidrogenación posterior. Tras su disolución en $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (3 mL, 1:1 v/v) sobre la mezcla se adicionó una cantidad catalítica de $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{C}$ (2 mg, 0.015 mmol) y se mantuvo bajo atmósfera de H_2 a t.a. durante 24 h. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite® y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto obtenido se purificó en primer lugar mediante cromatografía en columna en gel de sílice ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{ButOH}/\text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 4:3:2.5:1) y

posteriormente a través de una columna de intercambio iónico Amberlita® CG-50 (NH₄OH 1M en H₂O) que dio lugar al derivado **84** (28 mg, 80%).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz) δ 5.12 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.90 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 3.77 (dt, *J* = 10.1, 3.5 Hz, 1H), 3.66- 3.55 (m, 2H), 3.53 (dd, *J* = 9.8, 3.4 Hz, 1H), 3.49 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 3.46- 3.36 (m, 4H), 3.25 (dd, *J* = 9.7, 3.9 Hz, 1H), 3.22-3.15 (m, 4H), 2.90 (dt, *J* = 17.2, 10.0 Hz, 1H), 2.81 (ddd, *J* = 12.0, 9.5, 4.2 Hz, 1H), 1.90 (dt, *J* = 13.1, 4.3 Hz, 1H), 1.17 (q, *J* = 12.4 Hz, 1H).

¹³C RMN (D₂O, 125 MHz) δ: 101.2, 99.6, 87.2, 86.0, 74.4, 74.3, 72.3, 71.3, 68.8, 68.7, 62.4, 60.2, 54.8, 54.4, 50.5, 49.2, 34.4.

MS-API-ES: 477 (M+Na)⁺



Capítulo 5

Conclusiones

5.1.- Conclusiones.

En el primer capítulo 3 se ha sintetizado una nueva familia de aminoglicósidos que hemos denominado guanidino-glicósidos y cuya característica es que presentan en su estructura uno o varios aminos del antibiótico natural kanamicina A sustituido/s por un guanidinio.

Desde un punto de vista sintético, se ha demostrado que la desprotección selectiva de aminos mediante el tratamiento en medio básico de carbamatos resulta ser una metodología adecuada para la desprotección regioselectiva de algunos de los aminos del aminoglicósido kanamicina A. En particular nos ha permitido la desprotección de las posiciones 6' y 3'' simultáneamente o únicamente la posición 3'', dependiendo de la concentración de base y de la temperatura empleada. Por otro lado, se ha puesto a punto una metodología novedosa para la introducción selectiva de guanidinos en aminos primarios en moléculas poli-aminadas como es el caso de los aminoglicósidos.

Para la actividad biológica los datos obtenidos indican que en lo que respecta a la inactivación de los derivados sintéticos por las enzimas de resistencia, la presencia de 1 ó 2 grupos guanidinio en los derivados de kanamicina A no evita que estos compuestos sean sustratos de las enzimas, aunque se observa una disminución en la velocidad de reacción inicial significativa. Finalmente, en lo referido a su actividad antibiótica el compuesto con un guanidinio en la posición 3'' fue el único que mantuvo su actividad antibiótica tanto en cepas Gram-(+) como Gram(-) y también con cepas hospitalarias con diferentes fenotipos de resistencia. Estos datos indican que la modificación de la posición 3'' del anillo III puede ser tolerada por el receptor sin una importante pérdida de actividad, hecho de gran relevancia para ser empleado como punto de partida en el diseño de nuevos antibióticos.

En el capítulo 4 inicialmente se ha sintetizado un fragmento del antibiótico natural kanamicina A constituido por los anillos II y III con objeto de estudiar su posible utilización como farmacóforo en el diseño de nuevos antibióticos menos tóxicos.

Para su preparación se ha puesto a punto una ruta sintética útil y versátil no sólo para la obtención del fragmento desprotegido, sino también para su preparación en forma protegida, de modo que pueda ser utilizado para su posterior modificación. La

etapa clave la constituye una reacción de oxidación del anillo I y posterior eliminación del fragmento oxidado.

Posteriormente y a la vista de los buenos datos obtenidos para este fragmento llevamos a cabo el diseño y síntesis de un nuevo trisacárido en el que el anillo I fue sustituido por un resto de tipo 3-desoxi-3-amino-xilosa. Éste resultó ser ligando de las enzimas de resistencia, pero solo es sustrato de la enzima ANT(4') con muy baja velocidad de reacción inicial. De las otras enzimas no es sustrato por no presentar grupos modificables en dichas posiciones. De este modo este nuevo trisacárido puede resultar muy interesante para utilizarlo como punto de partida para el diseño de inhibidores y/o aceptores trampa de estas enzimas.

Sin embargo, y desgraciadamente, el nuevo derivado no presentó actividad antibiótica lo que nos permitió concluir que el grupo metilen-amino en 6' del anillo I es fundamental en la actividad antibiótica debido al contacto de éste con la A1408.



Capítulo 6

Bibliografía

6.1.- Bibliografía

1. Davies, J.; Davies, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417-433.
2. Livermore, D.M. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **2012**, *39*, 283-294.
3. Comunicación del Parlamento Europeo: *Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance*, COM **2011**, 748. http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/key_documents/index_en.htm
4. Cain, C.; Writer, S. *SciBx* **2012**, *5* (46), doi:10.1038/scibx.2012.1198.
5. (a) Boucher, H.W.; Talbot, G.H.; Bradley, J.S.; Edwards, J.E.; Gilbert, D.; Rice, L.B.; Sheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1-12. (b) Bush, K.; Courvalin, P.; Dantas, G.; Davies, J.; Eisenstein, B.; Huovinen, P.; Jacoby, G.A.; Kishony, R.; Kreiswirth, B.N.; Kutter, E.; Lerner, S.A.; Levy, S.; Lewis, K.; Lomovskaya, O.; Miller, J.H.; Mobashery, S.; Piddock, L.J.; Projan, S.; Thomas, C.M.; Tomasz, A.; Tulkens, P.M.; Walsh, T.R.; Watson, J.D.; Witkowski, J.; Witte, W.; Wright, G.; Yeh, P.; Zgurskaya, H.I. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 894-896.
6. Brad-Spellberg, M. D. *APUA Clinical Newsletter* **2012**, *30*, 8-10.
7. Gwynn, M.N.; Portnoy, A.; Rittenhouse, S.F.; Payne, D.J. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2010**, *1213*, 5-19.
8. Bush, K. *Curr. Op. Pharmacol.* **2012**, *12*, 527-534.
9. Comunicación de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas Americana: *Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives*, *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52* (suplemento 5), S397-S428.
10. (a) Silver, L.L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 71-109. (b) Critchley, I. A.; Draghi, D.C.; Sahm, D.F.; Thornsberry, C.; Jones, M.E.; Karlowsky, M.A. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 639-649.
11. Tally, F.P.; DeBruin, M.F. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46*, 523-526.
12. Thorne, G. M.; Alder, J. *Clin. Microbiol. Newsl.* **2002**, *24*, 33-40.
13. Cottarel, G.; Wierzbowski, J. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 547-555.
14. Jonhnsn, N.J.; Mukhtar, T.A.; Wright, G.D. *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 335-344.
15. Conly, J. M.; Johnston, M.D. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2005**, *16*, 159-160.

16. Bax, R.; Mullan, N.; Verhoef, J. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *16*, 51-59.
17. (a) Walsh, C. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, 1^a ed. Washington DC, **2003**. (b) Wong, C.-H.; Ritter, T.K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3508-3533.
18. Spratt, B.G.; Cromie, K.D. *Rev. Infect. Dis* **1988**, *10*, 699-711.
19. Williams, D. H. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 469-477.
20. Mazzei, T.; Mini, E.; Novelli, A.; Periti, P. *J. Antimicrob. Chemother.* **1993**, *31*, 1-9.
21. Schnappinger, D.; Hillen, W. *Arch. Microbiol.* **1996**, *165*, 359-369.
22. Becker, B.; Cooper, M.A. *ACS Chem.Biol.* **2013**, *8*, 105-115.
23. Jiang, Z.D.; DuPont H.L. *Chemotherapy* **2005**, *51*, 67-72.
24. Drlica, K.; Zhao, X. L. *Microbiol Mol Biol Rev* **1997**, *61*, 377-392.
25. Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B. *Food Technology and Biotechnology* **2008**, *46* (1), 11-21.
26. Wright, G. D. *Chemical communications* **2011**, *47* (14), 4055-4061.
27. De Pascale, G.; Wright, G. D. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1325-1334.
28. Jacoby, G. A. *Clinical microbiology reviews* **2009**, *22*, 161-182.
29. Ramirez, M. S.; Tolmasky, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes en *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2010**, *13* (6), 151-71.
30. Poole, K. *Annals of Medicine* **2007**, *39*, 162-176.
31. Delcour, A. H. *Biochimica et biophysica acta* **2009**, *1794* (5), 808-816.
32. Wright, G. D. *BMC Biology* **2010**, *8*, 123-128.
33. Greenwood, D. Antimicrobial Chemotherapy (Greenwood, D. ed.), 32-48, Oxford University Press, Oxford: 1995.
34. Waksman, S. A.; Lechavelier, H.A. *Science* **1949**, *109*, 305-307.
35. (a) Umezawa, H.; Hayano, S.; Ogata, Y. *Jpn. Med. J.* **1948**, *1*, 504-511. (b) Umezawa, H.; Takazi, T.; Okami, Y.; Fukuyama, S. *J. Antibiot.* **1949**, *3*, 232-235.
36. Thompson, P. E.; Ailes. B.; Herbst, S. F.; Olszewski, B.; Meisenhelder, J. E. *Antibiot. Chemother.* **1959**, *9*, 618-626.
37. Umezawa, H.; Ueda, M.; Maeda, K.; Yagishita, K.; Kondo, S.; Okami, Y.; Utahara, R.; Osato, Y.; Nitta, K.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1957**, *A10*, 181-188.
38. Umezawa, H. *Science* **1967**, *157*, 1559-1561.

39. Weinstein, M. J.; Wagman, G.H.; Oden, E.M.; Marquez, J.A. *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 789-790.
40. (a) Weinstein, M. J.; Marquez, J. A.; Testa, R. T.; Wagman, G. H.; Oden, E. M.; Waitz, J. A. *The Journal of antibiotics* **1970**, *23*(11), 551-554. (b) Waitz, J. A.; Moss, E. L. , Drabe, C. G.; Weinstein, M. J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1972**, *2*, 431-437.
41. Mitscher, L. A.; *Antibiotics and antimicrobial agents*. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore (Philadelphia), **2002**, 788-791.
42. Watanabe, T.; Goi, H.; Hara, T.; Sugano, T.; Tanaka, Y.; Kazuno, Y.; Matsushashi, Y.; Yamamoto, H.; Yokota, T. *The Japanese journal of antibiotics* **1987**, *40* (2), 349-356.
43. Magnet, S.; Blanchard, J. S. *Chemical reviews* **2005**, *105* (2), 477-498.
44. Jana, S.; Deb, J. K. *Applied microbiology and biotechnology* **2006**, *70* (2), 140-150.
45. Gale, E. F.; Cundliffe, E.; Reynolds, P.E.; Richmond, M.H.; Waring, M.J. *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, Wiley: London, **1981**.
46. (a) Hancock, R. E. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **1981**, *8* (6), 429-445. (b) Davis, B. D. *Microb Rev* **1987**, *51*, 341-350. (c) Taber, H. W.; Mueller, J. P.; Miller, P. F.; Arrow, A. S. *Microbiological reviews* **1987**, *51* (4), 439-457.
47. Hancock, R. E.; Farmer, S.W.; Li, Z.S.; Poole, K. *Antimicrob Agents Chemother.* **1991**, *35*, 1309-1314.
48. (a) Hancock, R. E. *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, *38*, 237-264. (b) Martin, N. L.; Beveridge, T.J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *29*, 1079-1087.
49. Bryan, L. E.; Kowand, S. K.; Van Den Elzen, H. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15* (1), 7-13.
50. (a) Bryan, L. E.; van den Elzen, H.M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *12*, 163-177. (b) Damper, P. D.; Epstein, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *20* (6), 803-808.
51. Bryan, L. E.; Kwan, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *23*, 835-845.
52. Minget-Leclercq, M. P.; Tulkens, P.M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1003-1012.
53. Moazed, D.; Noller, H.F. *Nature* **1987**, *327*, 387-394.

54. (a) Cunningham, P. R.; Nurse, K.; Bakin, A.; Weitzmann, C.J.; Pflumm, M.; Ofengand, J. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12012-12022. (b) Cunningham, P. R.; Nurse, K.; Weitzmann, C.J.; Ofengand, J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7172-7180.
55. Davies, J.; Gilbert, W.; Gorini, L. *PNAS* **1964**, *51*, 883-890.
56. (a) Davies, J.; Gorini, L.; Davis, B. D. *Molecular pharmacology* **1965**, *1* (1), 93-106. (b) Davies, J.; Davis, B. D. *J. Biol. Chem.* **1968**, *243* (12), 3312-3326.
57. Moazed, D.; Noller, H.F. *Cell* **1986**, *47*, 985-994.
58. (a) Moazed, D.; Noller, H.F. *J. Mol. Biol.* **1990**, *211*, 135-145. (b) Woodcock, J.; Moazed, D.; Cannon, M.; Davies, J.; Noller, H.F. *The EMBO journal* **1991**, *10*, 3099-3103.
59. Fourmy, D.; Recht, M. I.; Blanchard, S. C.; Puglisi, J. D. *Science* **1996**, *274* (5291), 1367-71.
60. Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Puglisi, J.D. *The EMBO journal* **1998**, *17*, 6437-6448.
61. (a) Schlutzen, F.; Tocilj, A.; Zarivach, R.; Harms, J.; Gluehmann, M.; Janell, D.; Bashan, A.; Bartels, H.; Agmon, I.; Franceschi, F.; Yonath, A. *Cell* **2000**, *102*, 615-623. (b) Winberly, B. T.; Brodersen, D.E.; Clemons, W.M.; Morgan-Warren, R.J.; Carter, A.P.; Vornrhein, C.; Hartsch, T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407*, 327-339.
62. Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. *Science* **2000**, *289*, 905-920.
63. Carter, A. P.; Clemons, W.M.; Brodersen, D.E.; Morgan-Warren, R.J.; Winberly, B.T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407*, 340-348.
64. (a) Fourmy, D.; Recht, M. I.; Puglisi, J. D. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277* (2), 347-362. (b) Fourmy, D.; Yoshizawa, S.; Puglisi, J.D. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 333-345. (c) Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Eason, R.G.; Puglisi, J.D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6263-6270.
65. (a) Vicens, Q.; Westhof, E. *Biopolymers* **2003** *70*, 42-57. (b) Francois, B.; Russell, R. J. M.; Murray, J. B.; Aboul-Ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. *Nucleic acids research* **2005**, *33*, 5677-5690.
66. (a) Noller, H. F. *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 191-227. (b) Purohit, P.; Stern, S.; *Nature* **1994**, *370*, 659-662. (c) Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Puglisi, J.D. *Science* **1999**, *285*, 1722-1725.

67. (a) Doherty, E. A.; Batey, R. T.; Masquida, B.; Doudna, J.A. *Nature structural biology* **2000**, 8, 339-343. (b) Nissen, P.; Ippolito, J.A.; Ban, N.; Moore, P.B.; Steitz, T.A. *PNAS* **2001**, 98, 4899-4903. (c) Ogle, J. M.; Brodersen, D.E.; Clemons, W.M.; Tarry, M.J.; Carter, A.P.; Ramakrishnan, V. *Science* **2001**, 292, 897-902.
68. (a) Pape, T.; Wintermeyer, W.; Rodnina, M.V. *Nature structural biology* **2000**, 7, 104-107; (b) Rodnina, M. V.; Wintermeyer, W. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 124-130. (c) Stahl, G.; McCarty, G.P.; Farabaugh, P.J. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 178-183.
69. Rodnina, M. V.; Daviter, T.; Gromadski, K., Wintermeyer, W. *Biochimie* **2002**, 84, 745-754.
70. (a) Vicens, Q.; Westhof, E. *Chemistry & biology* **2002**, 9 (6), 747-55. (b) Vicens, Q.; Westhof, E. *Structure* **2001**, 9, 647-658.
71. Wright, G. D.. *Current opinion in microbiology* **1999**, 2 (5), 499-503.
72. (a) Vakulenko, S. B.; Mobashery, S. *Clinical microbiology reviews* **2003**, 16, 430-450. (b) Wright, G. D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 499-503.
73. Hatch, R. A.; Schiller, N.L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 974-977.
74. Bryan, L. E.; O'Hara, K.; Wong, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, 26 (2), 250-255.
75. (a) Aires, J. R.; Kohler, T.; Nikaido, H.; Plesiat, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 2624-2628; (b) Masuda, N.; Sakagawa, E.; Ohya, S.; Gotoh, N.; Tsujimoto, H.; Nishino, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 3322-3327.
76. Putman, M.; van Veen, H.W.; Konings, W.N. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 672-693.
77. Cundliffe, E. *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, 43, 207-233.
78. Skeggs, P. A.; Thompson, J.; Cundliffe, E. *Molecular & general genetics : MGG* **1985**, 200 (3), 415-421.
79. (a) Thompson, J.; Skeggs, P. A.; Cundliffe, E. *Molecular & general genetics : MGG* **1985**, 201 (2), 168-173. (b) Doi, Y.; Wachino, J.; Yamane, K.; Shibata, N.; Yagi, T.; Shibayama, K.; Kato, H.; Arakawa, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48 (6), 2075-2080. (c) Yokoyama, K.; Doi, Y.; Yamane, K.; Kurokawa, H.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Yagi, T.; Kato, H.; Arakawa, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 491-496. (d) Doi, Y.; Yokoyama, K.;

- Yamane, K.; Wachino, J.; Shibata, N.; Yagi, T.; Shibayama, K.; Kato, H.; Arakawa, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 491-496.
80. (a) Galimand, M.; Courvalin, P.; Lambert, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2565-2571. (b) Yokoyama, K.; Doi, Y.; Yamane, K.; Kurokawa, H.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Yagi, T.; Kato, H.; Arakawa, Y. *The Lancet infectious diseases* **2003**, *362*, 1888-1893.
81. Meier, A.; Kirschner, P.; Bange, F.C.; Vogel, U.; Bottger, E.C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 228-233.
82. Yamane, K.; Wachino, J.; Doi, Y.; Kurokawa, H.; Arakawa, Y. *Emerging infectious diseases* **2005**, *11* (6), 951-953.
83. (a) Shaw, K. J.; Rather, P. N.; Hare, R. S.; Miller, G. H. *Microbiological reviews* **1993**, *57* (1), 138-163. (b) Hotta, K.; Ogata, T.; Ishikawa, J.; Okanishi, M.; Mizuno, S.; Morioka, M.; Naganawa, H.; Okami, Y. *The Journal of antibiotics* **1996**, *49* (7), 682-688.
84. Llano-Sotelo, B.; Azucena, E.F.; Kotra, L.P.; Mobashery, S.; Chow, C.S. *Chemistry & biology* **2002**, *9*, 455-463.
85. Forge, A.; Schacht, J. *Audiology & neuro-otology* **2000**, *5* (1), 3-22.
86. Keeling, K. M.; Bedwell, D.M. *Curr. Pharmacogenomics* **2005**, *3*, 259-269.
87. (a) Sener, G. S.; A.O. Altunbas, H.Z. Ersoy, Y. Paskaloglu, K. Arbak, S. Ayanoglu-Dulger, G. *J. Pineal Res.* **2002**, *32*, 231-236 (b) Kawamoto, Y. K. R.; Y. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2004**, *9*, 173-181.
88. Nagai, J.; Takano, M. *Drug Metab. Pharmacokinet* **2004**, *19*, 159-170.
89. Watanabe, A.; Nagai, J.; Adachi, Y.; Katsube, T.; Kitahara, Y.; Murakami, T.; Takano, M. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2004**, *95* (3), 423-433.
90. (a) Beauchamp, D.; Labrecque, G. *Current opinion in critical care* **2001**, *7* (6), 401-408. (b) Bartal C, Danon, A.; Schlaeffer, F.; Reisenberg, K.; Alkan, M.; Smoliakov, R.; Sidi, A.; Almog, Y. *The American journal of medicine* **2003**, *114*, 194-198.
91. (a) Umezawa, S. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* **1974**, *30*, 111-182. (b) Umezawa, S. *Pure and Applied Chemistry* **1978**, *50*, 1453-1476. (c) Nishimura, Y.; Umezawa, S. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23* (1), 85-86. (d)

- Nishimura, Y.; Umezawa, H.; Umezawa, S. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22 (1), 77-80.
92. (a) Umezawa, S. *The Japanese journal of antibiotics* **1979**, 32 Suppl, S60-72. (b) Tatsuta, K. A.; K.; Takahashi, H.; Hamatsu, T.; Annaka, M.; Kinoshita, M. *Bull. Chem. Soc. Japan* **1984**, 57, 529-538. (c) Kavadias, G. D.; P.; Masse, R.; Belleau, B. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne de Chimie* **1978**, 56, 2086-2092.
93. Fong, D. H.; Berghuis, A. M. *The EMBO journal* **2002**, 21 (10), 2323-2331.
94. (a) Kotram, L. P.; Mobashery, S. *Curr. Org. Chem.* **2001**, 5, 193-205. (b) Xin-Shan, Y.; Zhang, L. H. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9 (9), 929-939. (c) Li, J.; Zhang, C.-W.-T.; *Antiinfective Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, 5, 255-270. (d) Zhou, J.; Wang, G.; Zhang, L. H.; Ye, X. S. *Medicinal research reviews* **2007**, 27 (3), 279-316. (e) Fischbach, M. A.; Walsh, C.T. *Science* **2009**, 325, 1089-1093.
95. Roestamadji, J.; Grapsas, I.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (45), 11060-11069.
96. Nyffeler, P. T.; Liang, C. H.; Koeller, K. M.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124 (36), 10773-10778.
97. Johansson, H.; Pedersen, D.S. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 23, 4267-4281.
98. (a) Alper, P. B.; Hendrix, M.; Sears, P.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1965-1978. (b) Greenberg, W. A.; Priestley, E. S.; Sears, P. S.; Alper, P. B.; Rosenbohm, C.; Hendrix, M.; Hung, S. C.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121 (28), 6527-6541. (c) Sucheck, S. J.; Wong, A. L.; Koeller, K. M.; Boehr, D. D.; Draker, K.; Sears, P.; Wright, G. D.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122 (21), 5230-5231. (d) Sucheck, S. J.; Greenberg, W.A.; Torbert, T.J.; Wong, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 1080-1084.
99. (a) Yan, R.-B. Yang, F.; Wu, Y.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 8993-8995. (b) Titz, A.; Radic, Z.; Schawardt, O.; Ernst, D. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 2383-2385.
100. Santana, A. G.; Bastida, A.; Martinez del Campo, T.; Asensio, J.L.; Revuelta, J. *Synlett* **2011**, (2), 219-222.
101. Guo, J.; Xin-Shan, Y. *Molecules* **2010**, 15, 7235-7265.
102. Quader, S.; Boyd, S. E.; Jenkins, I. D.; Houston, T. A. *J. Org. Chem.* **2007**, 72 (6), 1962-1979.

-
103. (a) Ogawa, T.; Takamoto, T.; Hanessian, S. *Tetrahedron Lett.* **1974**, (46), 4013-4016. (b) Takamoto, T.; Hanessian, S. *Tetrahedron Lett.* **1974**, (46), 4009-4012. (c) Suami, T.; Nishiyama, S.; Ishikawa, Y.; Katsura, S. *Carbohydrate Research* **1976**, 52, 187-196.
104. Umezawa, S.; Kotó, S. *Bull. Chem. Soc. of Japan* **1966**, 39, 2014-2017.
105. Francois, B.; Szychowski, J.; Adhikari, S. S.; Pachamuthu, K.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Migawa, M. T.; Westhof, E.; Hanessian, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6735-6738.
106. Fridman, M.; Belakhov, V.; Yaron, S.; Baasov, T. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3575-3578.
107. Hainrichson, M.; Pokrovskaya, V.; Shallom-Shezifi, D.; Fridman, M.; Belakhov, V.; Shachar, D.; Yaronb, S.; Baasova, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5797-5807.
108. Hanessian, S.; Tremblay, M.; Swayze, E. E. *Tetrahedron* **2003**, 59 (7), 983-993.
109. Revuelta, J.; Vacas, T.; Corzana, F.; Gonzalez, C.; Bastida, A.; Asensio, J.L. *Chemistry-a European Journal* **2010**, 16 (10), 2986-2991.
110. Li, J.; Wange, J.; Czyryca, P. G.; Chang, H. W.; Orsak, T.; Evanson, R.; Chang, C. T. *Org. Lett.* **2004**, 6, 1381-1384.
111. Rai, R.; McAlexander, I.; Chang, C. W. T. *Organic Preparations and Procedures International* **2005**, 37 (4), 337-375.
112. Wang, J. H.; Li, J.; Tuttle, D.; Takemoto, J. Y.; Chang, C. W. T. *Org. Lett.* **2002**, 4 (23), 3997-4000.
113. (a) Bochkov, A. F.; Zaikov, G. E. *Chemistry of the O-Glycosidic Bond: Formation and Cleavage*. Pergamon Press: New York, **1979**. (b) Shallenberger, R. S.; Birch, G. *Sugar Chemistry*. AVI Pub. Company: Westport, Conn., **1975**.
114. Chang, C.-W. T.; Hui, Y.; Elchert, B.; Wang, J.; Li, J.; Rai, R. *Org. Lett.* **2002**, 4, 4603-4606.
115. Li, J.; Wang, J. H.; Hui, Y.; Chang, C. W. T. *Org. Lett.* **2003**, 5 (4), 431-434.
116. Rai, R.; Chen, H. N.; Czyryca, P. G.; Li, J.; Chang, C. W. T. *Org. Lett.* **2006**, 8 (5), 887-889.
117. (a) Michael, K.; Wang, H.; Tor, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7 (7), 1361-1371. (b) Tok, J. B.; Huffman, G. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10 (14), 1593-1595. (c) Tok, J. B.; Fenker, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11 (22), 2987-2991. (d) Tok, J. B.; Huffman, G. R.; Fenker, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 2987-2991. (e) Leudtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. *Biochemistry* **2003**, 42,

- 11391-11403. (f) Riguet, E. D.; J.; Boden, O.; Ludwig, V.; Gobel, M.; Bailly, C.; Decout, J.L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4651-4655. (g) Liang, C. H. Romero, A.; Rabuka, D.; Sbargi, P.W.; Marby, K.A.; Duffield, J.; Yao, S.; Cheng, M.L.; Ichikawa, Y.; Sears, P.; Hu, C.; Hwang, S.B.; Shue, Y.K.; Sucheck, S.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2123-2128. (h) Chen, G.-H.; Pan, P.; Chen, Y.; Meng, X.-B.; Li, Z.-J. *Tetrahedron* **2009**, *65* (31), 5922-5927.
118. Wang, H.; Tor, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (14), 1951-1956.
119. Kirk, S. R.; Tor, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (9), 1979-1991.
120. Sullivan, J. M.; Goodisman, J.; Dabrowiak, J. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (4), 615-618.
121. (a) Litovchick, A.; Evdokimov, A. G.; Lapidot, A. *Biochemistry* **2000**, *39* (11), 2838-2852. (b) Ahn, D.-D.; Yu, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1177-1183. (c) Hyun, S.; Lee, K. H.; Yu, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *16* (18), 4757-4759.
122. (a) Alguacil, J.; Defaus, S.; Claudio, A.; Trapote, A.; Masides, M.; Robles, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, (16), 3102-3109. (b) Mei, H. X.; L.; Cai, L.; Jin, H.-W.; Zhao, P.; Yang, Z.-J.; Zhang, L.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5355-5358. (c) Cai, L.; Xing, L.; Li, Q.; Ren, B.; Yang, Z.-J.; Zhang, L.-R.; Zhang, L.-H. *Tetrahedron* **2007**, *63* (34), 8135-8144. (d) Chares, I.; Xi, H.; Arya, D.P.; *Bioconjugate chemistry* **2007**, *18*, 160-169 (e) Charles, I.; Xue, L.; Arya, D. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (9), 1259-1262.
123. (a) Wu, S.; Fu, Y.; Yan, R.; Wu, Y.; Lei, X.; Ye, X.-S. *Tetrahedron* **2010**, *66* (19), 3433-3440. (b) Lee, J.; Kwon, M.; Lee, K.H.; Jeong, S.; Hyun, S.; ShIn, K.J.; Ju, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1956-1957. (c) Ding, Y.; Hofstadler, S. A.; Swayze, E. E.; Risen, L.; Griffey, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (29), 3409-3412. (d) Ding, Y.; Hofstadler, S.A.; Swayze, E.E.; Griffey, R.H. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1621-1623. (e) Wong, C.H.; Hendrix, M.; Manning, D. D.; Rosenbohm, C.; Greenberg, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (33), 8319-8327.
124. Pokrovskaya, V.; Belakhov, V.; Hainrichson, M.; Yaron, S.; Baasov, T. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (8), 2243-2254.
125. (a) Kondo, S. *The Japanese journal of antibiotics* **1979**, *32 Suppl*, S228-36. (b) Umezawa, H.; Miyasaka, T.; Iwasawa, H.; Ikeda, D.; Kondo, S. *Journal of Antibiotics* **1981**, *34* (12), 1635-1640; (c) Jikihara, T.; Tsuchiya, T.; Umezawa, S.; Umezawa, H. *Bull. Chem. Soc. of Japan* **1973**, *46* (11), 3507-3510. (d)

- Tsuchiya, T.; Takahashi, Y.; Endo, M.; Umezawa, S.; Umezawa, H. *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, *4* (4), 587-611. (e) Umezawa, S.; Umezawa, H.; Tsuchiya, T.; Ikeda, D. *Journal of Antibiotics* **1972**, *25* (10), 613-618.
126. (a) Koch, K. F.; Rhoades, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1970**, *10*, 309-313. (b) Koch, K. F.; Rhoades, J. A.; Hagaman, E. W.; Wenkert, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96* (10), 3300-3305.
127. Kondo, S.; Inuma, K.; Yamamoto, H.; Maeda, K.; Umezawa, H.. *Journal of Antibiotics* **1973**, *26* (7), 412-415.
128. (a) Tipson, R. S.; Cohen, A. *Carbohydr. Res.* **1965**, *1*, 338-340. (b) Suami, T.; Nishiyama, S.; Ishikawa, Y.; Katsura, S. *Carbohydr. Res.* **1977**, *53*, 239-246. (c) Matsuno, T.; Yoneta, T.; Fukatsu, S. *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 271-275.
129. Haddad, J.; Vakulenko, S.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11922-11923.
130. (a) Zhao, f.; Zhao, Q.; Blount, K. F.; Han, Q.; Tor, Y.; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5329-5334. (b) Blount, K. F.; Zhao, F.; Hermann, T.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (27), 9818-9829. (c) Hanessian, S.; Szychowski, J.; Campos-Reales Pineda, N. B.; Furtos, A.; Keillor, J. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (11), 3221-3225. (d) Kling, D.; Hesek, D.; Shi, Q.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (14), 5450-3.
131. (a) Asensio, J. L.; Hidalgo, A.; Bastida, A.; Torrado, M.; Corzana, F.; Chiara, J. L.; Garcia-Junceda, E.; Canada, J.; Jimenez-Barbero, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (23), 8278-9. (b) Bastida, A.; Hidalgo, A.; Chiara, J. L.; Torrado, M.; Corzana, F.; Perez-Canadillas, J. M.; Groves, P.; Garcia-Junceda, E.; Gonzalez, C.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (1), 100-116.
132. Li, J.; Chen, H. N.; Chang, H. W.; Wang, J. H.; Chang, C. W. T. *Org. Lett.* **2005**, *7* (14), 3061-3064.
133. (a) Schiffman, D. O. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **1977**, *238* (14), 1547-1550. (b) Zaske, D.; Crossley, K. *Minnesota medicine* **1978**, *61* (2), 123-6.
134. (a) Houghton, J. L.; Green, K. D.; Chen, W.; Garneau-Tsodikova, S. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 880-902. (b) Diaz, L.; Delgado, A. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2393-2418; (c) Dozzo, P.; Moser, H. E. *Expert opinion on therapeutic*

- patents* **2010**, 20 (10), 1321-1341. (d) Yang, L.; Ye, X. S. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, 10 (18), 1898-1926.
135. Silva, J. G.; Carvalho, I. *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14 (10), 1101-1119.
 136. Avent, M. L.; Rogers, B. A.; Cheng, A. C.; Paterson, D. L. *Int. Med. J.* **2011**, 41, 441-449.
 137. Hanessian, S.; Pachamuthu, K.; Szychowski, J.; Giguere, A.; Swayze, E. E.; Migawa, M. T.; Francois, B.; Kondo, J.; Westhof, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20 (23), 7097-7101.
 138. (a) Hobbie, S. N.; Akshay, S.; Kalapala, S. K.; Bruell, C. M.; Shcherbakov, D.; Bottger, E. C. *PNAS* **2008**, 105 (52), 20888-20893. (b) Matt, T.; Ng, C. L.; Lang, K.; Sha, S. H.; Akbergenov, R.; Shcherbakov, D.; Meyer, M.; Duscha, S.; Xie, J.; Dubbaka, S. R.; Perez-Fernandez, D.; Vasella, A.; Ramakrishnan, V.; Schacht, J.; Bottger, E. C. *PNAS* **2012**, 109 (27), 10984-10989.
 139. Lopez-Novoa, J. M.; Quiros, Y.; Vicente, L.; Morales, A. I.; Lopez-Hernandez, F. J. *Kidney international* **2011**, 79 (1), 33-45.
 140. Hainrichson, M.; Nudelman, I.; Baasov, T. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (2), 227-239.
 141. (a) Bush, K. *Current Opinion in Pharmacology* **2012**, 12 (5), 527-534. (b) Zhanel, G. G.; Lawson, C. D.; Zelenitsky, S.; Findlay, B.; Schweizer, F.; Adam, H.; Walkty, A.; Rubinstein, E.; Gin, A. S.; Hoban, D. J.; Lynch, J. P.; Karlowisky, J. A. *Expert review of anti-infective therapy* **2012**, 10 (4), 459-473. (c) Sutcliffe, J. A. Antibiotics in development targeting protein synthesis en *Antimicrobial Therapeutics Reviews: Antibiotics That Target the Ribosome*, 2011; Vol. 1241, pp 122-152.
 142. (a) Yuriev, E.; Ramsland, P. A. *Journal of Molecular Recognition* **2013**, 26 (5), 215-239. (b) Stark, J. L.; Powers, R. *Top. Curr. Chem.* **2012**, 326, 1-34. (c) Muegge, I.; Rarey, M. Small Molecule Docking and Scoring en *Reviews in Computational Chemistry, Vol 17*, Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B.; Eds. **2001**; Vol. 17, pp 1-60.
 143. (a) Hermann, T.; Westhof, E. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1250-1261. (b) Moitessier, N.; Westhof, E.; Hanessian, S. *J. Med. Chem* **2006**, 49, 1023-1033. (c) Barbaulta, F.; Ren, B.; Rebehmed, J.; Teixeira, C.; Luo, Y.; Smila-Castro, O.; Maurel, F.; Fan, B.-T.; Zhang, L.; Zhang, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 1648-1656.

-
144. Vicens, Q.; Westhof, E. *Biopolymers* **2003**, *70* (1), 42-57.
145. Han, Q.; Zhao, Q.; Fish, S.; Simonsen, K. B.; Vourloumis, D.; Froelich, J. M.; Wall, D.; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (18), 2694-2700.
146. Zhao, F.; Zhao, Q.; Blount, K. F.; Han, Q.; Tor, Y.; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (33), 5329-5334.
147. Murray, J. B.; Meroueh, S. O.; Russell, R. J.; Lentzen, G.; Haddad, J.; Mobashery, S. *Chemistry & biology* **2006**, *13*, 129-138.
148. Carlson, H. A. *Curr. Top. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 447-452.
149. (a) Rougier, F.; Claude, D.; Maurin, M.; Maire, P. *Current drug targets. Infectious disorders* **2004**, *4* (2), 153-162. (b) Guthrie, O. W. *Toxicology* **2008**, *249* (2-3), 91-96.
150. Lakshmi P. K., H., J., Mobashery, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3249-3266.
151. Kawaguchi, H. *The Journal of infectious diseases* **1976**, *134*, 242-248.
152. (a) Baker, T. J.; Luedtke, N. W.; Tor, Y.; Goodman, M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (26), 9054-9058. (b) Luedtke, N. W.; Baker, T. J.; Goodman, M.; Tor, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (48), 12035-12036.
153. Litovchick, A.; Evdokimov, A. G.; Lapidot, A. *FEBS Lett.* **1999**, *445* (1), 73-79.
154. Fair, R. J.; Hensler, M. E.; Thienphrapa, W.; Dam, Q. N.; Nizet, V.; Tor, Y. *ChemMedChem* **2012**, *7* (7), 1237-1244.
155. (a) Revuelta, J.; Vacas, T.; Torrado, M.; Corzana, F.; Gonzalez, C.; Jimenez-Barbero, J.; Menendez, M.; Bastida, A.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5086-103. (b) Corzana, F.; Cuesta, I.; Freire, F.; Revuelta, J.; Torrado, M.; Bastida, A.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (10), 2849-2865.
156. Jao, R. L. Jackson, G. G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1963**, *161*, 148-152.
157. Weinstein, M. J.; Wagman, G. H.; Marquez, J. A.; Testa, R. T.; Waitz, J. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, *7* (3), 246-249.
158. Sandoval, R. M. R.; J. P.; Running, W.; Campos, S. B.; Santos, J. R.; Phillips, C. L.; Molitoris, B. A. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 2697-2705.
159. (a) Tsuchiya, T. Takagi, Y.; Umezawa, S.; *Tetrahedron Lett.* **1979**, *51*, 4951-4954; (b) Nagabhushan, T. L.; Cooper, A. B.; Turner, W. N.; Tsai, H.; McCombie, S.; Mallams, A. K.; Rane, D.; Wright, J. J.; Reichert, P.; Boxler, D. L.; Weinstein, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5253-5254.

160. Li, J.; Chiang, F.-I.; Chen, H.-N.; Chang, C.-W. T. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (24), 7711-7719.
161. (a) Haddad, J.; Kotra, L. P.; Llano-Sotelo, B.; Kim, C.; Azucena, E. F.; Liu, M. Z.; Vakulenko, S. B.; Chow, C. S.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (13), 3229-3237. (b) Takagi, Y.; Komuro, C.; Tsuchiya, T.; Umezawa, S. *Bull Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 1834-1837; (c) Torii, T.; Tsuchiya, T.; Umezawa, S. *The Journal of antibiotics* **1982**, *35*, 58-61. (d) Sharma, M. N.; Kumar, V.; Remers, W. A. *The Journal of antibiotics* **1982**, *35* (7), 905-10. (e) Kumar, V.; Remers, W. A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3327-3331. (f) Chen, G.-H.; Pan, P.; Yao, Y.; Chen, Y.; Meng, X.-B.; Li, Z.-J. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9078-9087.
162. Grapsas, I.; Cho, Y. J.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (7), 1918-1922.
163. Gao, F.; Yan, X.; Zahr, O.; Larsen, A.; Vong, K.; Auclair, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (20), 5518-5522.
164. Ham, Y. J.; Yu, H.; Kim, N. D.; Hah, J.-M.; Selim, K. B.; Choi, H. G.; Sim, T. *Tetrahedron* **2012**, *68* (7), 1918-1925.
165. (a) Lo, M.-C.; Aulagaugh, A.; Jin, G.; Cowling, R.; Bard, J.; Malamas, M.; Ellestad, G. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 153-159. (b) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 2212-2221. (c) Matulis, D.; Kranz, J. K.; Salemme, F. R.; Todd, M. *Journal of biochemistry* **2005**, *44*, 5258-5266. (d) Senisterra, G. L.; Markin, E.; Yamazaki, K.; Hui, R.; Vedadi, M.; Awrey, D. E. *J. Biomol. screening* **2006**, *11*, 940-948. (e) Vedadi, M.; Niesen, F. H.; Allali-Hassani, A.; Fedorev, O. Y.; Finerty, P. J.; Wasney, G. A.; Yeung, R.; Arrowsmith, C.; Ball, L. J.; Berglund, H.; Hui, R.; Marsden, B. D.; Nordlund, P.; Sundstr, M.; Weigelt, J.; Edwards, A. M. *PNAS* **2006**, *103*, 15835-15840. (f) Flipo, M.; Willand, N.; Lecat-Guillet, N.; Hounsou, C.; Roses, M.; Leroux, F.; Lens, Z.; Villeret, V.; Wohlkonig, A.; Wintjens, R.; Christophe, T.; Jon, H.-K.; Loch, C.; Brodin, P.; Baulard, A. R.; Deprez, B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6391-6402.
166. (a) Corzana, F.; Cuesta, I.; Bastida, A.; Hidalgo, A.; Latorre, M.; Gonzalez, C.; Garcia-Junceda, E.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11* (17), 5102-5113. (b) Revuelta, J.; Corzana, F.; Bastida, A.; Asensio, J. L. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (29), 8635-8640. (c) Green, K. D.; Chen, W.; Houghton, J. L.; Fridman, M.; Garneau-Tsodikova, S. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 119-126.

167. (a) Staple, D. W.; Venditti, V.; Niccolai, N.; Elson-Schwab, L.; Tor, Y.; Butcher, S. E. *ChemBioChem* **2008**, *9* (1), 93-102; (b) Elson-Schwab, L.; Garner, O. B.; Schuksz, M.; Crawford, B. E.; Esko, J. D.; Tor, Y. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (18), 13585-13591. (c) Hui, Y.; Ptak, R.; Paulman, R.; Rallanschb, M.; Chang, C.-W. T. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9255-9257.
168. Li, Y.; Shen, J.; Sun, X.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. *Journal of chemical information and modeling* **2010**, *50* (6), 1134-1146.
169. Pedersen, L. C.; Benning, M. M.; Holden, H. M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13305-13311.
170. (a) Liang, C.; Pedersen, J. A.; Balser, T. C. *Journal of chromatography: A* **2009**, *1216* (27), 5296-301. (b) Nurizzo, D.; Shewry, S. C.; Perlin, M. H.; Brown, S. A.; Dholakia, J. N.; Fuchs, R. L.; Deva, T.; Baker, E. N.; Smith, C. A. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327* (2), 491-506.
171. Vetting, M. W.; Park, C. H.; Hegde, S. S.; Jacoby, G. A.; Hooper, D. C.; Blanchard, J. S. *Biochemistry* **2008**, *47* (37), 9825-35.
172. (a) Cooper, D. J. *Pure and applied chemistry. Chimie pure et appliquee* **1971**, *28* (4), 455-67. (b) Claes, P. J.; Busson, R.; Vanderhaeghe, H. *Journal of chromatography* **1984**, *298*, 445-457; (c) Deubner, R.; Schollmayer, C.; Wienen, F.; Holzgrabe, U. *Magnetic resonance in chemistry : MRC* **2003**, *41*, 589-598.
173. Moon, M. S.; Jun, S. J.; Lee, S. H.; Cheong, C. S.; Kim, K. S.; Lee, B. S. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 607-609.
174. Asensio, J. L.; Bastida, A.; Jimenez-Barbero, J. Studies on the conformational features of neomycin-B and its molecular recognition by RNA and bacterial defense proteins. In *Bioactive Conformation II*, Peters, T.; Ed. **2008**; Vol. 273, pp 117-138.
175. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd ed.* New York, **1989**.
176. (a) Goodsell, D. S.; Olson, A. J. *Proteins* **1990**, *8*, 195-202. (b) Goodsell, D. S.; Lauble, H.; Stout, C. D.; Olson, A. J. *Proteins* **1993**, *17*, 1-10. (c) Goodsell, D. S.; Morris, G. M.; Olson, A. J. *J. Mol. Recog.* **1996**, *9*, 1-5. (d) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. *J. Comp. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
177. Böttger, E. C.; Springer, B.; Prammananan, T.; Kidan, Y.; Sander, P. *The EMBO journal* **2001**, *2*, 318-323.

178. Fan-Minogue, H.; Bedwell, D. M. *RNA* **2008**, *14* (1), 148-57.
179. Salian, S.; Matt, T.; Akbergenov, R.; Harish, S.; Meyer, M.; Duscha, S.; Shcherbakov, D.; Bernet, B. B.; Vasella, A.; Westhof, E.; Bottger, E. C. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **2012**, *56*, 6104-6108.
180. (a) Kondo, J.; Hainrichson, M.; Nudelman, I.; Shallom-Shezifi, D.; Barbieri, C. M.; Pilch, D. S.; Westhof, E.; Baasov, T. *ChemBioChem* **2007**, *8* (14), 1700-1709. (b) Hermann, T.; Tereshko, V.; Skripkin, E.; Patel, D. J. *Blood Cells, Molecules and Diseases* **2007**, *38*, 193-198. (c) Kondo, J.; Francois, B.; Urzhumtsev, A.; Westhof, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (20), 3310-3314.
181. Auerbach, T.; Bashan, A.; Yonath, A.; *TRENDS in Biotechnology* **2004**, *22*, 570-576.
182. (a) Burke, J. F.; Mogg, A. E. *Nucleic acids research* **1985**, *13* (17), 6265-72. (b) Manuvakhova, M.; Keeling, K.; Bedwell, D. M. *RNA* **2000**, *6* (7), 1044-1055.
183. Nudelman, I.; Rebibo-Sabbah, A.; Shallom-Shezifi, D.; Hainrichson, M.; Stahl, I.; Ben-Yosef, T.; Baasov, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (24), 6310-6315.
184. Pathak, R.; Bottger, E. C.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2967-2985.
185. Busscher, G. F.; Rutjes, F. P.; van Delft, F. L. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (3), 775-91.
186. Alper, P. B.; Hendrix, M.; Sears, P.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (9), 1965-1978.
187. (a) van den Broek, S. A. M. W.; Gruijters, B. W. T.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L.; Blaaauw, R. H. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (9), 3577-3580. (b) Hanessian, S.; Szychowski, J.; Adhikari, S. S.; Vasquez, G.; Kandasamy, P.; Swayze, E. E.; Migawa, M. T.; Ranken, R.; Francois, B.; Wirmer-Bartoschek, J.; Kondo, J.; Westhof, E. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (10), 2352-2369. (c) Klemm, C. M.; Berthelmann, A.; Neubacher, S.; Arenz, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, (17), 2788-2794.
188. Roslund, M. U.; Aitio, O.; Wärnå, J.; Maaheimo, H.; Murzin, D. Y.; Leino, R. J. *Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8769-8772.
189. Jean-Luc, M.; Feng, T.; Matthew, E. H.; Frost, J. W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3897-3899.
190. Zhang, W.; Chen, Y.; Liang, Q.; Li, H.; Jin, H.; Zhang, L.; Meng, X.; Li, Z. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (2), 400-409.

191. (a) Yu, M.; Pagenkopf, B. L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4553-4558. (b) Sannigrahi, M.; Mayhew, D. L.; Clive, D. L. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2776-2788.
192. (a) Georgiadis, M. P. C.-K.; V. *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, *10*, 739-748. (b) Park, W. K. C.; Auer, M.; Jaksche, H.; Wong, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10150-10155.